

## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

## NOTIFICATION D'ELECTION

(règle 61.2 du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

Assistant Commissioner for Patents  
United States Patent and Trademark  
Office  
Box PCT  
Washington, D.C.20231  
ETATS-UNIS D'AMERIQUE

en sa qualité d'office élu

Date d'expédition (jour/mois/année) 01 septembre 2000 (01.09.00)	
Demande internationale no PCT/FR00/00105	Référence du dossier du déposant ou du mandataire B0024WO
Date du dépôt international (jour/mois/année) 19 janvier 2000 (19.01.00)	Date de priorité (jour/mois/année) 27 janvier 1999 (27.01.99)
Déposant DHELLIN, Olivier etc	

1. L'office désigné est avisé de son élection qui a été faite:



dans la demande d'examen préliminaire international présentée à l'administration chargée de l'examen préliminaire international le:

08 juillet 2000 (08.07.00)



dans une déclaration visant une élection ultérieure déposée auprès du Bureau international le:

2. L'élection



a été faite



n'a pas été faite

avant l'expiration d'un délai de 19 mois à compter de la date de priorité ou, lorsque la règle 32 s'applique, dans le délai visé à la règle 32.2b).

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse no de télécopieur: (41-22) 740.14.35	Fonctionnaire autorisé Diana Nissen no de téléphone: (41-22) 338.83.38
--	--

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

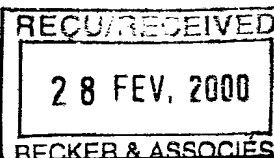
NOTIFICATION DE LA RECEPTION DE  
L'EXEMPLAIRE ORIGINAL

(règle 24.2.a) du PCT)

Expéditeur: le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

BECKER, Philippe  
Cabinet Becker et Associés  
10, rue de Milan  
F-75009 Paris  
FRANCE



Date d'expédition (jour/mois/année) 11 février 2000 (11.02.00)	NOTIFICATION IMPORTANTE
Référence du dossier du déposant ou du mandataire B0024WO	Demande internationale no PCT/FR00/00105

Il est notifié au déposant que le Bureau international a reçu l'exemplaire original de la demande internationale précisée ci-après.

Nom(s) du ou des déposants et de l'Etat ou des Etats pour lesquels ils sont déposants:

AP CELLS INC. etc. (pour tous les Etats désignés sauf US)  
DHELLIN, Olivier etc. (pour US seulement)

Date du dépôt international : 19 janvier 2000 (19.01.00)  
Date(s) de priorité revendiquée(s) : 27 janvier 1999 (27.01.99)  
Date de réception de l'exemplaire original  
par le Bureau international : 01 février 2000 (01.02.00)  
Liste des offices désignés :

AP : GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW

EA : AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM

EP : AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE

OA : BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG

National : AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB,  
GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK,  
MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW

## ATTENTION

Le déposant doit soigneusement vérifier les indications figurant dans la présente notification. En cas de divergence entre ces indications et celles que contient la demande internationale, il doit aviser immédiatement le Bureau international.

En outre, l'attention du déposant est appelée sur les renseignements donnés dans l'annexe en ce qui concerne

- ☒ les délais dans lesquels doit être abordée la phase nationale
- ☒ la confirmation des désignations faites par mesure de précaution
- ☒ les exigences relatives aux documents de priorité.

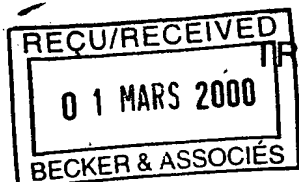
Une copie de la présente notification est envoyée à l'office récepteur et à l'administration chargée de la recherche internationale.

Bureau international de l'OMPI 34, chemin des Colombettes 1211 Genève 20, Suisse	Fonctionnaire autorisé R. Raissi
n° de télécopieur (41-22) 740.14.35	n° de téléphone (41-22) 338.83.38

BEST AVAILABLE COPY

BEST AVAILABLE COPY

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

PCT

Expéditeur : le BUREAU INTERNATIONAL

Destinataire:

BECKER, Philippe  
Cabinet Becker et Associés  
10, rue de Milan  
F-75009 Paris  
FRANCE

**NOTIFICATION RELATIVE  
A LA PRESENTATION OU A LA TRANSMISSION  
DU DOCUMENT DE PRIORITE**

(instruction administrative 411 du PCT)

Date d'expédition (jour/mois/année) 23 février 2000 (23.02.00)	<b>NOTIFICATION IMPORTANTE</b>
Référence du dossier du déposant ou du mandataire B0024WO	
Demande internationale no PCT/FR00/00105	Date du dépôt international (jour/mois/année) 19 janvier 2000 (19.01.00)
Date de publication internationale (jour/mois/année) Pas encore publiée	Date de priorité (jour/mois/année) 27 janvier 1999 (27.01.99)
Déposant AP CELLS INC. etc	

1. La date de réception (sauf lorsque les lettres "NR" figurent dans la colonne de droite) par le Bureau international du ou des documents de priorité correspondant à la ou aux demandes énumérées ci-après est notifiée au déposant. Sauf indication contraire consistant en un astérisque figurant à côté d'une date de réception, ou les lettres "NR", dans la colonne de droite, le document de priorité en question a été présenté ou transmis au Bureau international d'une manière conforme à la règle 17.1.a) ou b).
2. Ce formulaire met à jour et remplace toute notification relative à la présentation ou à la transmission du document de priorité qui a été envoyée précédemment.
3. Un astérisque(\*) figurant à côté d'une date de réception dans la colonne de droite signale un document de priorité présenté ou transmis au Bureau international mais de manière non conforme à la règle 17.1.a) ou b). Dans ce cas, l'attention du déposant est appelée sur la règle 17.1.c) qui stipule qu'aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.
4. Les lettres "NR" figurant dans la colonne de droite signalent un document de priorité que le Bureau international n'a pas reçu ou que le déposant n'a pas demandé à l'office récepteur de préparer et de transmettre au Bureau international, conformément à la règle 17.1.a) ou b), respectivement. Dans ce cas, l'attention du déposant est appelée sur la règle 17.1.c) qui stipule qu'aucun office désigné ne peut décider de ne pas tenir compte de la revendication de priorité avant d'avoir donné au déposant la possibilité de remettre le document de priorité dans un délai raisonnable en l'espèce.

<u>Date de priorité</u>	<u>Demande de priorité n°</u>	<u>Pays, office régional ou office récepteur selon le PCT</u>	<u>Date de réception du document de priorité</u>
27 janv 1999 (27.01.99)	99/00886	FR	04 févr 2000 (04.02.00)

Bureau international de l'OMPI  
34, chemin des Colombettes  
1211 Genève 20, Suisse

no de télécopieur (41-22) 740.14.35

Fonctionnaire autorisé:

Carlos Naranjo

no de téléphone (41-22) 338.83.38

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# TRAITÉ DE COOPÉRATION EN MATIÈRE DE BREVETS

## PCT

**NOTIFICATION DE RECEPTION  
DES DOCUMENTS SUPPOSÉS CONSTITUER  
UNE DEMANDE INTERNATIONALE**  
(instruction administrative 301 du PCT)

Demande internationale n° <b>PCT / FR 00 / 00105</b>
Référence du dossier du déposant ou du mandataire <b>B0024WO</b>
Date d'expédition (jour/mois/année) <b>19 JAN. 2000</b>

Expéditeur : L'OFFICE RÉCEPTEUR

Destinataire :

CABINET BECKER ET ASSOCIES  
10 rue de Milan  
75009 PARIS  
(France)

**NOTIFICATION IMPORTANTE**

Date de réception (jour/mois/année)

**19 JAN. 2000**

Déposant **AP CELLS INC. et al**

de l'invention

**PROCEDE DE PREPARATION DE VESICULES MEMBRANAIRES**

- Il est notifié au déposant que l'office récepteur a reçu à la date de réception indiquée ci-dessus des documents supposés constituer une demande internationale.
- L'attention du déposant est appelée sur le fait que **l'office récepteur n'a pas encore vérifié si ces documents** satisfont aux conditions de l'article 11.1), c'est-à-dire s'ils remplissent les conditions nécessaires pour que soit attribuée une date de dépôt international.
- Dès que l'office récepteur aura vérifié ces documents, il en avisera le déposant.
- Le numéro de demande internationale indiqué plus haut a été provisoirement attribué à ces documents. Le déposant est invité à mentionner ce numéro dans toute correspondance avec l'office récepteur.

### Nombre d'exemplaires

☒ Requête

☐ Pouvoir

☒ Versement des taxes  
d'un montant de : FRF 15 652,69

☒ Description

☐ Document (s)  
de priorité

☐ Listage de séquence de nucléotides  
ou d'acides aminés (disquette)

☒ Revendications (25)

☒ Rapport de  
Recherche

☐ Autres documents

☒ Dessin (s) (11)

☒ Abrégé

Nom et adresse postale de l'office récepteur  
**Institut National de la Propriété Industrielle**  
**26 bis, rue de Saint-Petersbourg - 75800 Paris Cedex 08**  
n° de télécopieur 01 42 94 27 99

Affaire suivie par :

**B. PIQUET**

n° de téléphone :

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# PCT

## REQUÊTE

Le soussigné requiert que la présente demande internationale soit traitée conformément au Traité de coopération en matière de brevets.

Réservé à l'office récepteur

Demande internationale n°

Date du dépôt international

Nom de l'office récepteur et "Demande internationale PCT"

Référence du dossier du déposant ou du mandataire (facultatif)  
(12 caractères au maximum) B0024WO

### Cadre n° I TITRE DE L'INVENTION

PROCEDE DE PREPARATION DE VESICULES MEMBRANAIRES

### Cadre n° II DÉPOSANT

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'État où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

AP CELLS INC.  
1014 Hamilton Court  
MENLO PARK, CA 94025  
(Etats-Unis)

☐ Cette personne est aussi inventeur.

n° de téléphone

n° de télécopieur

n° de téléimprimeur

Nationalité (nom de l'État) :

ETATS-UNIS

Domicile (nom de l'État) :

ETATS-UNIS

Cette personne est déposant pour :

☐

tous les États désignés

☒

tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique

☐

les États-Unis d'Amérique seulement

☐

les États indiqués dans le cadre supplémentaire

### Cadre n° III AUTRE(S) DÉPOSANT(S) OU (AUTRE(S)) INVENTEUR(S)

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'État où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE  
LA RECHERCHE MEDICALE  
101 rue de Tolbiac  
75654 PARIS CEDEX 13  
(France)

Cette personne est :

☒ déposant seulement

☐ déposant et inventeur

☐ inventeur seulement  
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'État) :

FRANCE

Domicile (nom de l'État) :

FRANCE

Cette personne est déposant pour :

☐

tous les États désignés

☒

tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique

☐

les États-Unis d'Amérique seulement

☐

les États indiqués dans le cadre supplémentaire

☒ D'autres déposants ou inventeurs sont indiqués sur une feuille annexe.

### Cadre n° IV MANDATAIRE OU REPRÉSENTANT COMMUN; OU ADRESSE POUR LA CORRESPONDANCE

La personne dont l'identité est donnée ci-dessous est/a été désignée pour agir au nom du ou des déposants auprès des autorités internationales compétentes, comme:

☒

mandataire

☐

représentant commun

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays.)

BECKER Philippe  
CABINET BECKER ET ASSOCIES  
10 rue de Milan  
75009 PARIS  
(France)

n° de téléphone

01 44 53 84 00

n° de télécopieur

01 44 53 84 10

n° de téléimprimeur

☐ Adresse pour la correspondance : cocher cette case lorsque aucun mandataire ni représentant commun n'est/n'a été désigné et que l'espace ci-dessous est utilisé pour indiquer une adresse spéciale à laquelle la correspondance doit être envoyée.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Suite du cadre n° III AUTRE(S) DÉPOSANT(S) OU (AUTRE(S)) INVENTEUR(S)

Si aucun des sous-cadres suivants n'est utilisé, cette feuille ne doit pas être incluse dans la requête.

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom: pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

INSTITUT CURIE  
26 rue d'Ulm  
75248 PARIS CEDEX 05  
(France)

Cette personne est :

- ☒ déposant seulement  
☐ déposant et inventeur  
☐ inventeur seulement  
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) :  
FRANCE

Domicile (nom de l'Etat) :  
FRANCE

Cette personne est déposant pour : ☐ tous les États désignés ☒ tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique ☐ les États-Unis d'Amérique seulement ☐ les États indiqués dans le cadre supplémentaire

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom: pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

DHELLIN Olivier  
60 Boulevard de Charonne  
75020 PARIS  
(France)

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement  
☒ déposant et inventeur  
☐ inventeur seulement  
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) :  
FRANCE

Domicile (nom de l'Etat) :  
FRANCE

Cette personne est déposant pour : ☐ tous les États désignés ☐ tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique ☒ les États-Unis d'Amérique seulement ☐ les États indiqués dans le cadre supplémentaire

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom: pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

AMIGORENA Sebastian  
124 Boulevard A. Blanqui  
75013 PARIS  
(France)

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement  
☒ déposant et inventeur  
☐ inventeur seulement  
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) :  
FRANCE

Domicile (nom de l'Etat) :  
FRANCE

Cette personne est déposant pour : ☐ tous les États désignés ☐ tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique ☒ les États-Unis d'Amérique seulement ☐ les États indiqués dans le cadre supplémentaire

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom: pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

RAMEAU Philippe  
22, allée Albert Thomas  
91300 MASSY  
(France)

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement  
☒ déposant et inventeur  
☐ inventeur seulement  
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) :  
FRANCE

Domicile (nom de l'Etat) :  
FRANCE

Cette personne est déposant pour : ☐ tous les États désignés ☐ tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique ☒ les États-Unis d'Amérique seulement ☐ les États indiqués dans le cadre supplémentaire

☒ D'autres déposants ou inventeurs sont indiqués sur une autre feuille annexe.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## Suite du cadre n° III AUTRE(S) DÉPOSANT(S) OU (AUTRE(S)) INVENTEUR(S)

*Si aucun des sous-cadres suivants n'est utilisé, cette feuille ne doit pas être incluse dans la requête.*

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

CROUZET Joël

12, Rue Michel Voisin  
92330 SCEAUX  
(France)

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement
- ☒ déposant et inventeur
- ☐ inventeur seulement  
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) :  
FRANCE

Domicile (nom de l'Etat) :  
FRANCE

Cette personne est  
déposant pour :

- ☐ tous les États désignés ☐ tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique ☒ les États-Unis d'Amérique seulement ☐ les États indiqués dans le cadre supplémentaire

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement
- ☐ déposant et inventeur
- ☐ inventeur seulement  
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) :

Domicile (nom de l'Etat) :

Cette personne est  
déposant pour :

- ☐ tous les États désignés ☐ tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique ☐ les États-Unis d'Amérique seulement ☐ les États indiqués dans le cadre supplémentaire

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement
- ☐ déposant et inventeur
- ☐ inventeur seulement  
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) :

Domicile (nom de l'Etat) :

Cette personne est  
déposant pour :

- ☐ tous les États désignés ☐ tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique ☐ les États-Unis d'Amérique seulement ☐ les États indiqués dans le cadre supplémentaire

Nom et adresse : (Nom de famille suivi du prénom; pour une personne morale, désignation officielle complète. L'adresse doit comprendre le code postal et le nom du pays. Le pays de l'adresse indiquée dans ce cadre est l'Etat où le déposant a son domicile si aucun domicile n'est indiqué ci-dessous.)

Cette personne est :

- ☐ déposant seulement
- ☐ déposant et inventeur
- ☐ inventeur seulement  
(Si cette case est cochée, ne pas remplir la suite.)

Nationalité (nom de l'Etat) :

Domicile (nom de l'Etat) :

Cette personne est  
déposant pour :

- ☐ tous les États désignés ☐ tous les États désignés sauf les États-Unis d'Amérique ☐ les États-Unis d'Amérique seulement ☐ les États indiqués dans le cadre supplémentaire

☐ D'autres déposants ou inventeurs sont indiqués sur une autre feuille annexe.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**Cadre n° V DÉSIGNATION D'ÉTATS**

Les désignations suivantes sont faites conformément à la règle 4.9.a) (cocher les cases appropriées; une au moins doit l'être) :

**Brevet régional****TZ République-Unie de Tanzanie**

- ☒ **AP** Brevet **ARIPO** : GH Ghana, GM Gambie, KE Kenya, LS Lesotho, MW Malawi, SD Soudan, SL Sierra Leone, SZ Swaziland, UG Ouganda, ZW Zimbabwe et tout autre État qui est un État contractant du Protocole de Harare et du PCT
- ☒ **EA** Brevet **eurasien** : AM Arménie, AZ Azerbaïdjan, BY Bélarus, KG Kirghizistan, KZ Kazakhstan, MD République de Moldova, RU Fédération de Russie, TJ Tadjikistan, TM Turkménistan et tout autre État qui est un État contractant de la Convention sur le brevet eurasienn et du PCT
- ☒ **EP** Brevet **européen** : AT Autriche, BE Belgique, CH et LI Suisse et Liechtenstein, CY Chypre, DE Allemagne, DK Danemark, ES Espagne, FI Finlande, FR France, GB Royaume-Uni, GR Grèce, IE Irlande, IT Italie, LU Luxembourg, MC Monaco, NL Pays-Bas, PT Portugal, SE Suède et tout autre État qui est un État contractant de la Convention sur le brevet européen et du PCT
- ☒ **OA** Brevet **OAPI** : BF Burkina Faso, BJ Bénin, CF République centrafricaine, CG Congo, CI Côte d'Ivoire, CM Cameroun, GA Gabon, GN Guinée, GW Guinée-Bissau, ML Mali, MR Mauritanie, NE Niger, SN Sénégal, TD Tchad, TG Togo et tout autre État qui est un État membre de l'OAPI et un État contractant du PCT (si une autre forme de protection ou de traitement est souhaitée, le préciser sur la ligne pointillée) . . . . .

**Brevet national (si une autre forme de protection ou de traitement est souhaitée, le préciser sur la ligne pointillée) :**

- |  |   |
|--|---|
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AE</b> Émirats arabes unis                        | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LR</b> Liberia   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AL</b> Albanie                                    | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LS</b> Lesotho   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AM</b> Arménie                                    | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LT</b> Lituanie  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AT</b> Autriche                                   | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LU</b> Luxembourg  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AU</b> Australie                                  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>LV</b> Lettonie  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>AZ</b> Azerbaïdjan                                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MD</b> République de Moldova   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BA</b> Bosnie-Herzégovine                         | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MG</b> Madagascar  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BB</b> Barbade                                    | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MK</b> Ex-République yougoslave de Macédoine                                       |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BG</b> Bulgarie                                   |   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BR</b> Brésil                                     | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MN</b> Mongolie  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>BY</b> Bélarus                                    | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MW</b> Malawi  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CA</b> Canada                                     | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MX</b> Mexique   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CH et LI</b> Suisse et Liechtenstein              | <input checked="" type="checkbox"/> <b>NO</b> Norvège   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CN</b> Chine                                      | <input checked="" type="checkbox"/> <b>NZ</b> Nouvelle-Zélande  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CU</b> Cuba                                       | <input checked="" type="checkbox"/> <b>PL</b> Pologne   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>CZ</b> République tchèque                         | <input checked="" type="checkbox"/> <b>PT</b> Portugal  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>DE</b> Allemagne                                  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>RO</b> Roumanie  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>DK</b> Danemark                                   | <input checked="" type="checkbox"/> <b>RU</b> Fédération de Russie  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>EE</b> Estonie                                    | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SD</b> Soudan  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>ES</b> Espagne                                    | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SE</b> Suède   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>FI</b> Finlande                                   | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SG</b> Singapour   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GB</b> Royaume-Uni                                | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SI</b> Slovénie  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GD</b> Grenade                                    | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SK</b> Slovaquie   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GE</b> Géorgie                                    | <input checked="" type="checkbox"/> <b>SL</b> Sierra Leone  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GH</b> Ghana                                      | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TJ</b> Tadjikistan   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>GM</b> Gambie                                     | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TM</b> Turkménistan  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>HR</b> Croatie                                    | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TR</b> Turquie   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>HU</b> Hongrie                                    | <input checked="" type="checkbox"/> <b>TT</b> Trinité-et-Tobago   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>ID</b> Indonésie                                  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>UA</b> Ukraine   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>IL</b> Israël                                     | <input checked="" type="checkbox"/> <b>UG</b> Ouganda   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>IN</b> Inde                                       | <input checked="" type="checkbox"/> <b>US</b> États-Unis d'Amérique   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>IS</b> Islande                                    |   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>JP</b> Japon                                      | <input checked="" type="checkbox"/> <b>UZ</b> Ouzbékistan   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KE</b> Kenya                                      | <input checked="" type="checkbox"/> <b>VN</b> Viet Nam  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KG</b> Kirghizistan                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>YU</b> Yougoslavie   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KP</b> République populaire démocratique de Corée | <input checked="" type="checkbox"/> <b>ZA</b> Afrique du Sud  |
|  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>ZW</b> Zimbabwe  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KR</b> République de Corée                        | Cases réservées pour la désignation d'États qui sont devenus parties au PCT après la publication de la présente feuille : |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>KZ</b> Kazakhstan                                 | <input checked="" type="checkbox"/> <b>CR</b> Costa Rica  |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>LC</b> Sainte-Lucie                               | <input checked="" type="checkbox"/> <b>DM</b> Dominique   |
| <input checked="" type="checkbox"/> <b>LK</b> Sri Lanka                                  | <input checked="" type="checkbox"/> <b>MA</b> Maroc   |

**Déclaration concernant les désignations de précaution :** outre les désignations faites ci-dessus, le déposant fait aussi conformément à la règle 4.9.b) toutes les désignations qui seraient autorisées en vertu du PCT, à l'exception de toute désignation indiquée dans le cadre supplémentaire comme étant exclue de la portée de cette déclaration. Le déposant déclare que ces désignations additionnelles sont faites sous réserve de confirmation et que toute désignation qui n'est pas confirmée avant l'expiration d'un délai de 15 mois à compter de la date de priorité doit être considérée comme retirée par le déposant à l'expiration de ce délai. (Pour confirmer une désignation, il faut déposer une déclaration contenant la désignation en question et payer les taxes de désignation et de confirmation. La confirmation doit parvenir à l'office récepteur dans le délai de 15 mois.)

12

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

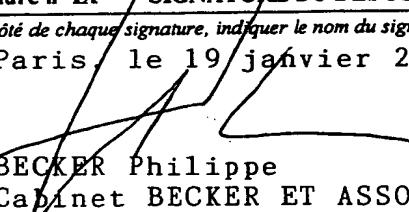
Cadre n° VI REVENDEICATION DE PRIORITÉ		<input type="checkbox"/> D'autres revendications de priorité sont indiquées dans le cadre supplémentaire.		
Date de dépôt de la demande antérieure (jour/mois/année)	Numéro de la demande antérieure	Lorsque la demande antérieure est une :		
		demande nationale : pays	demande régionale : * office régional	demande internationale : office récepteur
(1) 27/01/1999 (27 janvier 1999)	99 00886	FRANCE		
(2)				
(3)				

☒ L'office récepteur est prié de préparer et de transmettre au Bureau international une copie certifiée conforme de la ou des demandes antérieures (seulement si la demande antérieure a été déposée auprès de l'office qui, aux fins de la présente demande internationale, est l'office récepteur) indiquées ci-dessus au(x) point(s) : (1)

\* Si la demande antérieure est une demande ARIPO, il est obligatoire d'indiquer dans le cadre supplémentaire au moins un pays partie à la Convention de Paris pour la protection de la propriété industrielle pour lequel cette demande antérieure a été déposée (règle 4.10.b)ii). Voir le cadre supplémentaire.

Cadre n° VII ADMINISTRATION CHARGÉE DE LA RECHERCHE INTERNATIONALE			
Choix de l'administration chargée de la recherche internationale (ISA) (si plusieurs administrations chargées de la recherche internationale sont compétentes pour procéder à la recherche internationale, indiquer l'administration choisie; le code à deux lettres peut être utilisé) : <b>ISA /</b>	Demandes d'utilisation des résultats d'une recherche antérieure; mention de cette recherche (si une recherche antérieure a été effectuée par l'administration chargée de la recherche internationale ou demandée à cette dernière) : Date (jour/mois/année)      Numéro      Pays (ou office régional) 05/11/1999      FA 571682      FRANCE		

Cadre n° VIII BORDEREAU; LANGUE DE DÉPÔT	
La présente demande internationale contient le nombre de feuilles suivant :  requête : 5 description (sauf partie réservée au listage des séquences) : 36 revendications : 5 abrégé : 1 dessins : 11 partie de la description réservée au listage des séquences : /  Nombre total de feuilles : 58	Le ou les éléments cochés ci-après sont joints à la présente demande internationale : 1. <input checked="" type="checkbox"/> feuille de calcul des taxes 2. <input type="checkbox"/> pouvoir distinct signé 3. <input type="checkbox"/> copie du pouvoir général; numéro de référence, le cas échéant : 4. <input type="checkbox"/> explication de l'absence d'une signature 5. <input type="checkbox"/> document(s) de priorité indiqué(s) dans le cadre n° VI au(x) point(s) : 6. <input type="checkbox"/> traduction de la demande internationale en (langue) : 7. <input type="checkbox"/> indications séparées concernant des micro-organismes ou autre matériel biologique déposés 8. <input type="checkbox"/> listage des séquences de nucléotides ou d'acides aminés sous forme déchiffrable par ordinateur 9. <input checked="" type="checkbox"/> autres éléments (préciser) : Rapport de Recherche Préliminaire
Figure des dessins qui doit accompagner l'abrégé : --	Langue de dépôt de la demande internationale : français

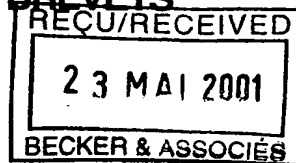
Cadre n° IX SIGNATURE DU DÉPOSANT OU DU MANDATAIRE
À côté de chaque signature, indiquer le nom du signataire et, si cela n'apparaît pas clairement à la lecture de la requête, à quel titre l'intéressé signe. Paris, le 19 janvier 2000   <b>BECKER Philippe</b> <b>Cabinet BECKER ET ASSOCIES</b>

Réservé à l'office récepteur	
1. Date effective de réception des pièces supposées constituer la demande internationale :	2. Dessins : <input type="checkbox"/> reçus :  <input type="checkbox"/> non reçus :
3. Date effective de réception, rectifiée en raison de la réception ultérieure, mais dans les délais, de documents ou de dessins complétant ce qui est supposé constituer la demande internationale :	
4. Date de réception, dans les délais, des corrections demandées selon l'article 11.2) du PCT :	
5. Administration chargée de la recherche internationale (si plusieurs sont compétentes) : <b>ISA /</b>	6. <input type="checkbox"/> Transmission de la copie de recherche différée jusqu'au paiement de la taxe de recherche.

Réservé au Bureau international
Date de réception de l'exemplaire original par le Bureau international :

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS



Expéditeur: L'ADMINISTRATION CHARGÉE DE  
L'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Destinataire:

BECKER, Philippe  
CABINET BECKER & ASSOCIÉS  
10, rue de Milan  
F-75009 Paris  
FRANCE

PCT

NOTIFICATION DE TRANSMISSION DU  
RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE  
INTERNATIONAL  
(règle 71.1 du PCT)

Date d'expédition  
(jour/mois/année) 21.05.2001

Référence du dossier du déposant ou du mandataire  
B0024WO

## NOTIFICATION IMPORTANTE

Demande internationale No.  
PCT/FR00/00105

Date du dépôt international (jour/mois/année)  
19/01/2000

Date de priorité (jour/mois/année)  
27/01/1999

Déposant  
AP CELLS INC. et al.

1. Il est notifié au déposant que l'administration chargée de l'examen préliminaire international a établi le rapport d'examen préliminaire international pour la demande internationale et le lui transmet ci-joint, accompagné, le cas échéant, de ces annexes.

2. Une copie du présent rapport et, le cas échéant, de ses annexes est transmise au Bureau international pour communication à tous les offices élus.

3. Si tel ou tel office élu l'exige, le Bureau international établira une traduction en langue anglaise du rapport (à l'exclusion des annexes de celui-ci) et la transmettra aux offices intéressés.

### 4. RAPPEL

Pour aborder la phase nationale auprès de chaque office élu, le déposant doit accomplir certains actes (dépôt de traduction et paiement des taxes nationales) dans le délai de 30 mois à compter de la date de priorité (ou plus tard pour ce qui concerne certains offices) (article 39.1) (voir aussi le rappel envoyé par le Bureau international dans le formulaire PCT/IB/301).

Lorsqu'une traduction de la demande internationale doit être remise à un office élu, elle doit comporter la traduction de toute annexe du rapport d'examen préliminaire international. Il appartient au déposant d'établir la traduction en question et de la remettre directement à chaque office élu intéressé.

Pour plus de précisions en ce qui concerne les délais applicables et les exigences des offices élus, voir le Volume II du Guide du déposant du PCT.

Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international



Office européen des brevets  
D-80298 Munich  
Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d  
Fax: +49 89 2399 - 4465

Fonctionnaire autorisé

Hundt, D

Tél. +49 89 2399-8042



**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## CERTIFICATE

I, Martine NION,

of Cabinet Becker & Associés  
10 rue de Milan  
F-75009 PARIS (France),

do hereby declare that I am conversant with the French and English Languages,  
and that the attached translation signed by me is, to the best of my knowledge and  
belief, a true and correct translation of the Annex to the International Preliminary  
Examination Report concerning International Patent Application  
PCT/FR 00/00105.

Dated : June 6, 2001

Signed : M. Nion  
Martine NION

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

24. Use of anion exchange chromatography in combination with affinity chromatography for the preparation or purification of membrane vesicles.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

09/ 890,319

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

(PCT Article 36 and Rule 70)

TECH CENTER 1600/2900

MAY 1 7 2002

RECEIVED

Applicant's or agent's file reference B0024WO	<b>FOR FURTHER ACTION</b> See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/FR00/00105	International filing date (day/month/year) 19 January 2000 (19.01.00)	Priority date (day/month/year) 27 January 1999 (27.01.99)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC A61K 35/12		
Applicant AP CELLS INC.		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>7</u> sheets, including this cover sheet.  <input checked="" type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT).  These annexes consist of a total of <u>1</u> sheets.
3. This report contains indications relating to the following items:  I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input checked="" type="checkbox"/> Priority III <input checked="" type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input checked="" type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input checked="" type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 08 July 2000 (08.07.00)	Date of completion of this report 21 May 2001 (21.05.2001)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/00105

## I. Basis of the report

### 1. With regard to the elements of the international application:\*

- ☐ the international application as originally filed
- ☒ the description:  
 pages 1-36, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☒ the claims:  
 pages 1-23, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, as amended (together with any statement under Article 19  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages 24, filed with the letter of 12 March 2001 (12.03.2001)
- ☒ the drawings:  
 pages 1/11-11/11, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_
- ☐ the sequence listing part of the description:  
 pages \_\_\_\_\_, as originally filed  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the demand  
 pages \_\_\_\_\_, filed with the letter of \_\_\_\_\_

### 2. With regard to the language, all the elements marked above were available or furnished to this Authority in the language in which the international application was filed, unless otherwise indicated under this item.

These elements were available or furnished to this Authority in the following language \_\_\_\_\_ which is:

- ☐ the language of a translation furnished for the purposes of international search (under Rule 23.1(b)).
- ☐ the language of publication of the international application (under Rule 48.3(b)).
- ☐ the language of the translation furnished for the purposes of international preliminary examination (under Rule 55.2 and/or 55.3).

### 3. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international preliminary examination was carried out on the basis of the sequence listing:

- ☐ contained in the international application in written form.
- ☐ filed together with the international application in computer readable form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in written form.
- ☐ furnished subsequently to this Authority in computer readable form.
- ☐ The statement that the subsequently furnished written sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed has been furnished.
- ☐ The statement that the information recorded in computer readable form is identical to the written sequence listing has been furnished.

### 4. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description, pages \_\_\_\_\_
- ☐ the claims, Nos. \_\_\_\_\_
- ☐ the drawings, sheets/fig \_\_\_\_\_

### 5. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).\*\*

\* Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report since they do not contain amendments (Rule 70.16 and 70.17).

\*\* Any replacement sheet containing such amendments must be referred to under item 1 and annexed to this report.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/00105

## II. Priority

1. ☐ This report has been established as if no priority had been claimed due to the failure to furnish within the prescribed time limit the requested:
- ☐ copy of the earlier application whose priority has been claimed.
  - ☐ translation of the earlier application whose priority has been claimed.

2. ☒ This report has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid.

Thus for the purposes of this report, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.

3. Additional observations, if necessary:

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/00105

## III. Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application.

☒ claims Nos. 1-24

because:

☐ the said international application, or the said claims Nos. \_\_\_\_\_  
relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination (*specify*):

☐ the description, claims or drawings (*indicate particular elements below*) or said claims Nos. \_\_\_\_\_  
are so unclear that no meaningful opinion could be formed (*specify*):

☒ the claims, or said claims Nos. 1-24(part) are so inadequately supported  
by the description that no meaningful opinion could be formed.

☐ no international search report has been established for said claims Nos. \_\_\_\_\_

2. A meaningful international preliminary examination cannot be carried out due to the failure of the nucleotide and/or amino acid sequence listing to comply with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions:

☐ the written form has not been furnished or does not comply with the standard.

☐ the computer readable form has not been furnished or does not comply with the standard.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR00/00105

## VI. Certain documents cited

### 1. Certain published documents (Rule 70.10)

Application No. Patent No.	Publication date (day/month/year)	Filing date (day/month/year)	Priority date (valid claim) (day/month/year)
WO99/03499	28 November 1999 (28.11.1999)	03 July 1998 (03.07.1998)	16 July 1997 (16.07.1997)

### 2. Non-written disclosures (Rule 70.9)

Kind of non-written disclosure	Date of non-written disclosure (day/month/year)	Date of written disclosure referring to non-written disclosure (day/month/year)

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 00/00105

## I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

1. The amendments submitted with the letter dated 12/03/2001 do not extend the subject matter of the application beyond the content of the application as filed. They therefore fulfil the requirements of PCT Article 34(2)(b).

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 00/00105

## Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: II.

### Priority

The priority date claimed is not considered valid for part of the subject matter of 8-16, 18-22 and 24 in so far as no support has been found in the priority document with respect to the use of affinity chromatography. Thus, document D4, which is cited in the international search report as a P document, is considered to form part of the prior art under the terms of PCT Article 33(2) and (3) for the subject matter of **Claims 8-16, 18-22 and 24**, relating to the use of affinity chromatography (PCT Rule 64.1).

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/FR 00/00105

## Supplemental Box

(To be used when the space in any of the preceding boxes is not sufficient)

Continuation of: III.

**Claims 1-24** are not entirely supported by the description and do not meet the requirements of PCT Article 6. Consequently, a valid opinion with respect to the novelty, inventive step or industrial applicability of said claims can only be formulated as regards the subject matter of those claims that are entirely supported by the description; for this purpose, the term "membrane vesicles" is interpreted as meaning "exosomes".

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

## INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.  
PCT/FR 00/00105

## V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

## 1. Statement

Novelty (N)	Claims	1-24	YES
	Claims		NO
Inventive step (IS)	Claims	1-24	YES
	Claims		NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-24	YES
	Claims		NO

## 2. Citations and explanations

1. Reference is made to the following documents:

**D1:** FR-A-2 766 205 (INSERM ET AL), 22 January 1999.

**D2:** G. RAPOSO ET AL. JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 183, March 1996, pages 1161-1172.

**D2:** WO 97 05900 A (RIJKSUNIVERSITEIT TE LEIDEN) 20 February 1997.

**D4:** WO 99 03499 A (INSERM ET AL.) 28 January 1999.

2. Novelty (PCT Article 33(1) and (2))

Claims 1, 5, 11, 17, 18, 23 and 24 cover methods (or uses) for preparing exosomes using anion exchange chromatography, affinity chromatography or gel permeation chromatography. The prior art (D1-D3) describes methods for preparing exosomes using differential centrifugation. D4 describes the use of ion exchange chromatography and gel permeation chromatography for purifying exosomes (page 27, lines 15-19); however, these uses are covered by the priority documents. Consequently, **Claims 1-24** are novel.

3. Inventive step (PCT Article 33(1) and (3))

D1-D3 describe the use of differential centrifugation to

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

prepare exosomes, wherein the resulting exosomes contain various contaminants that preclude the therapeutic use thereof. The problem addressed in the present application therefore resides in providing exosomes devoid of contaminants and the means for preparing same. The solution proposed is to use anion exchange and/or gel permeation chromatography, optionally combined with affinity chromatography. None of the prior art documents cited mentions or suggests this solution. Hence, **Claims 1-24** are inventive.

4. Industrial applicability (PCT Article 33(1)-(4))

**Claims 1-24** relate to methods for preparing membrane vesicles, and are therefore industrially applicable.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/FR 00/00105

## VIII. Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

**Claims 1, 5, 11, 17, 18, 23 and 24** are not supported by the description under the terms of PCT Article 6, since the scope thereof is broader than that defined by the description. Even if the term "membrane vesicles" is clearly defined in the description, no technical support has been found regarding the preparation of membrane vesicles other than exosomes.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS

## PCT

### RAPPORT D'EXAMEN PRELIMINAIRE INTERNATIONAL

(article 36 et règle 70 du PCT)



Référence du dossier du déposant ou du mandataire B0024WO	<b>POUR SUITE A DONNER</b> voir la notification de transmission du rapport d'examen préliminaire international (formulaire PCT/IPEA/416)	
Demande internationale n° PCT/FR00/00105	Date du dépôt international (jour/mois/année) 19/01/2000	Date de priorité (jour/mois/année) 27/01/1999
Classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois classification nationale et CIB A61K35/12		
Déposant AP CELLS INC. et al.		

1. Le présent rapport d'examen préliminaire international, établi par l'administration chargée de l'examen préliminaire international, est transmis au déposant conformément à l'article 36.
2. Ce RAPPORT comprend 7 feuilles, y compris la présente feuille de couverture.
  - ☒ Il est accompagné d'ANNEXES, c'est-à-dire de feuilles de la description, des revendications ou des dessins qui ont été modifiées et qui servent de base au présent rapport ou de feuilles contenant des rectifications faites auprès de l'administration chargée de l'examen préliminaire international (voir la règle 70.16 et l'instruction 607 des Instructions administratives du PCT).

Ces annexes comprennent 1 feuilles.

3. Le présent rapport contient des indications relatives aux points suivants:

- I ☒ Base du rapport
- II ☒ Priorité
- III ☒ Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle
- IV ☐ Absence d'unité de l'invention
- V ☒ Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration
- VI ☒ Certains documents cités
- VII ☐ Irrégularités dans la demande internationale
- VIII ☒ Observations relatives à la demande internationale

Date de présentation de la demande d'examen préliminaire internationale 08/07/2000	Date d'achèvement du présent rapport 21.05.2001
Nom et adresse postale de l'administration chargée de l'examen préliminaire international:  Office européen des brevets D-80298 Munich Tél. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Fonctionnaire autorisé Perez, F N° de téléphone +49 89 2399 7338 

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# RAPPORT D'EXAMEN PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL

Demande internationale n° PCT/FR00/00105

## I. Bas du rapport

1. En ce qui concerne les **éléments** de la demande internationale (*les feuilles de remplacement qui ont été remises à l'office récepteur en réponse à une invitation faite conformément à l'article 14 sont considérées dans le présent rapport comme "initialement déposées" et ne sont pas jointes en annexe au rapport puisqu'elles ne contiennent pas de modifications (règles 70.16 et 70.17)*):

### Description, pages:

1-36 version initiale

### Revendications, N°:

1-23 version initiale

24 reçue(s) le 12/03/2001 avec la lettre du 12/03/2001

### Dessins, feuilles:

1/11-11/11 version initiale

2. En ce qui concerne la **langue**, tous les éléments indiqués ci-dessus étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue dans laquelle la demande internationale a été déposée, sauf indication contraire donnée sous ce point.

Ces éléments étaient à la disposition de l'administration ou lui ont été remis dans la langue suivante: , qui est :

- ☐ la langue d'une traduction remise aux fins de la recherche internationale (selon la règle 23.1(b)).
- ☐ la langue de publication de la demande internationale (selon la règle 48.3(b)).
- ☐ la langue de la traduction remise aux fins de l'examen préliminaire internationale (selon la règle 55.2 ou 55.3).

3. En ce qui concerne les **séquences de nucléotides ou d'acide aminés** divulguées dans la demande internationale (le cas échéant), l'examen préliminaire internationale a été effectué sur la base du listage des séquences :

- ☐ contenu dans la demande internationale, sous forme écrite.
- ☐ déposé avec la demande internationale, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme écrite.
- ☐ remis ultérieurement à l'administration, sous forme déchiffrable par ordinateur.
- ☐ La déclaration, selon laquelle le listage des séquences par écrit et fourni ultérieurement ne va pas au-delà de la divulgation faite dans la demande telle que déposée, a été fournie.
- ☐ La déclaration, selon laquelle les informations enregistrées sous déchiffrable par ordinateur sont identiques à celles du listage des séquences Présenté par écrit, a été fournie.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**RAPPORT D'EXAMEN  
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/00105

4. Les modifications ont entraîné l'annulation :

- ☐ de la description, pages :
- ☐ des revendications, n°s :
- ☐ des dessins, feuilles :

5. ☐ Le présent rapport a été formulé abstraction faite (de certaines) des modifications, qui ont été considérées comme allant au-delà de l'exposé de l'invention tel qu'il a été déposé, comme il est indiqué ci-après (règle 70.2(c)) :

*(Toute feuille de remplacement comportant des modifications de cette nature doit être indiquée au point 1 et annexée au présent rapport)*

6. Observations complémentaires, le cas échéant :

*voir feuille séparée*

**II. Priorité**

1. ☐ Le présent rapport a été formulée comme si aucune priorité n'avait été revendiquée, du fait que les documents suivants n'ont pas été remis dans le délai prescrit :

- ☐ copie de la demande antérieure dont la priorité a été revendiquée.
- ☐ traduction de la demande antérieure dont la priorité a été revendiquée.

2. ☒ Le présent rapport a été formulée comme si aucune priorité n'avait été revendiquée, du fait que la revendication de la priorité a été jugée non valable.

Pour les besoins du présent rapport, la date de dépôt international indiquée plus haut est donc considérée comme la date pertinente.

3. Observations complémentaires, le cas échéant :

**III. Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle**

1. La question de savoir si l'objet de l'invention revendiquée semble être nouveau, impliquer une activité inventive (ne pas être évident) ou être susceptible d'application industrielle n'a pas été examinée pour ce qui concerne :

- ☐ l'ensemble de la demande internationale.
- ☒ les revendications n°s 1-24.

parce que :

- ☐ la demande internationale, ou les revendications n°s en question, se rapportent à l'objet suivant, à l'égard duquel l'administration chargée de l'examen préliminaire international n'est pas tenue effectuer un examen préliminaire international (*préciser*) :

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**RAPPORT D'EXAMEN  
PRÉLIMINAIRE INTERNATIONAL**

Demande internationale n° PCT/FR00/00105

- ☐ la description, les revendications ou les dessins (*en indiquer les éléments ci-dessous*), ou les revendications n° en question ne sont pas clairs, de sorte qu'il n'est pas possible de formuler une opinion valable (*préciser*) :
- ☒ les revendications, ou les revendications n° 1-24 (in part) en question, ne se fondent pas de façon adéquate sur la description, de sorte qu'il n'est pas possible de formuler une opinion valable.
- ☐ il n'a pas été établi de rapport de recherche internationale pour les revendications n° en question.

2. Le listage des séquences de nucléotides ou d'acides aminés n'est pas conforme à la norme prévue dans l'annexe C des instructions administratives, de sorte qu'il n'est pas possible d'effectuer un examen préliminaire international significatif:

- ☐ le listage présenté par écrit n'a pas été fourni ou n'est pas conforme à la norme.
- ☐ le listage sous forme déchiffrable par ordinateur n'a pas été fourni ou n'est pas conforme à la norme.

**V. Déclaration motivée selon l'article 35(2) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui de cette déclaration**

1. Déclaration

Nouveauté	Oui : Revendications 1-24
	Non : Revendications
Activité inventive	Oui : Revendications 1-24
	Non : Revendications
Possibilité d'application industrielle	Oui : Revendications 1-24
	Non : Revendications

2. Citations et explications  
**voir feuille séparée**

**VI. Certain documents cités**

1. Certains documents publiés (règle 70.10)  
et / ou

2. Divulgations non écrites (règle 70.9)

**voir feuille séparée**

**VIII. Observations relatives à la demande internationale**

Les observations suivantes sont faites au sujet de la clarté des revendications, de la description et des dessins et de la question de savoir si les revendications se fondent entièrement sur la description :

**voir feuille séparée**

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**Concernant le point I****Base de l'opinion**

1. Les modifications introduites avec la lettre du 12/03/2001 n'étendent pas l'objet de la demande au-delà du contenu de la demande telle qu'elle a été déposée. Elles n'enfreignent donc pas les dispositions de l'article 34(2) b) PCT (USPTO)

**Concernant le point II****Priorité**

2. La date de priorité revendiquée n'a pas été trouvée valide pour une partie de l'objet des revendications 8-16, 18-22, 24 dans la mesure où aucun support n'a pu être établi dans le document de priorité vis à vis de l'utilisation de la chromatographie d'affinité. Ainsi le document D4 cité dans le rapport international de recherche en tant que document P est considéré comme faisant partie de l'état de la technique aux fins de l'article 33.2 et 33.3 pour l'objet des **revendications 8-16, 18-22, 24** relatif à l'utilisation de la chromatographie d'affinité (Règle 64.1 PCT).

**Concernant le point III****Absence de formulation d'opinion quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle**

3. Les **revendications 1-24** ne sont se fondent pas entièrement sur la description et ne satisfont pas aux conditions requises à l'article 6 PCT. En conséquence, une opinion valable ne peut être formée au sujet de la nouveauté, de l'activité inventive, ou de l'application industrielle des dites revendications que sur l'objet des revendications entièrement fondé sur la description, c'est à dire que le terme "vésicules membranaires" est interprété comme "exosomes".

**Concernant le point V****Déclaration motivée selon la règle 66.2(a)(ii) quant à la nouveauté, l'activité inventive et la possibilité d'application industrielle; citations et explications à l'appui d cette déclaration**

4. Il est fait référence aux documents suivants:

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**D1:** FR-A-2 766 205 (INSERM ET AL.) 22 janvier 1999.

**D2:** G. RAPOSO ET AL. JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 183, mars 1996, pages 1161-1172.

**D3:** WO 97 05900 A (RIJKSUNIVERSITEIT TE LEIDEN) 20 février 1997.

**D4:** WO 99 03499 A (INSERM ET AL.) 28 janvier 1999.

5. Nouveauté (Articles 33.1 et 33.2 PCT)

Les revendications 1, 5, 11, 17, 18, 23, 24 couvrent des procédés (ou des utilisations) permettant de préparation d'exosomes par chromatographie d'échange d'anions, par chromatographie d'affinité ou par chromatographie de perméation de gel. L'état de la technique (D1-D3) décrit des procédés de préparation d'exosomes par centrifugation différentielle. D4 décrit l'utilisation de chromatographie d'échange d'ion et de perméation de gel pour la purification d'exosomes (page 27 ligne 15 - 19); toutefois ces utilisations sont couvertes par le document de priorité. En conséquence, les **revendications 1-24** sont nouvelles.

6. Activité inventive (Articles 33.1 et 33.3 PCT)

D1-D3 décrivent l'utilisation de la centrifugation différentielle pour la préparation d'exosomes, les exosomes ainsi obtenus contiennent divers contaminants les rendant impropres à une utilisation thérapeutique. Le problème posé par la présente application consiste donc à fournir des exosomes sans contaminants et le moyen de les préparer. La solution proposée consiste à utiliser la chromatographie d'échange d'anions et/ou de perméation de gel, éventuellement en association avec la chromatographie d'affinité. Aucun des documents cités dans l'état de la technique ne mentionne ou suggère cette solution. En conséquence, les **revendications 1-24** sont inventives.

7. Application industrielle (Articles 33.1 et 33.4 PCT)

Les **revendications 1-24** portent sur des procédés de préparation de vésicules membranaires et sont donc susceptibles d'application industrielle.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

**RAPPORT D'EXAMEN**  
**PRELIMINAIRE INTERNATIONAL - FEUILLE SEPARÉE**

---

Demande internationale n° PCT/FR00/00105

**Concernant le point VI**

**Certains documents cités**

**8. Certains documents publiés (Règle 70.10 PCT)**

Demande No	Date de publication	Date de dépôt	Date de priorité (revendications valides)
Brevet No	(jour/mois/année)	(jour/mois/année)	(jour/mois/année)
WO99/03499	28.01.99	03.07.98	16.07.97

**Concernant le point VIII**

**Observations relatives à la demande internationale**

9. Les revendications 1, 5, 11, 17, 18, 23, 24 ne se fondent pas sur la description, comme l'exige l'article 6 PCT, vu que leur portée est plus vaste que celle qui est justifiée par la description. En effet bien que le terme "vésicules membranaires" soit clairement défini dans la description, aucun support technique n'a pu être trouvé concernant la préparation de vésicules membranaires autre que des exosomes.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

24. Utilisation de la chromatographie d'échange d'anions en combinaison avec la chromatographie d'affinité pour la préparation ou la purification de vésicules membranaires.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIÈRE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets <sup>6</sup> :</b> <b>A61K 35/12, C12N 5/06, A61K 39/00</b>	<b>A2</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale:</b> <b>WO 00/44389</b> <b>(43) Date de publication internationale:</b> 3 août 2000 (03.08.00)
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR00/00105 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 19 janvier 2000 (19.01.00) <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 99/00886 27 janvier 1999 (27.01.99) FR <b>(71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> AP CELLS INC. [US/US]; 1014 Hamilton Court, Menlo Park, CA 94025 (US). INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cedex 13 (FR). INSTITUT CURIE [FR/FR]; 26, rue d'Ulm, F-75248 Paris Cedex 05 (FR). <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> DHELLIN, Olivier [FR/FR]; 60, boulevard de Charonne, F-75020 Paris (FR). AMIGORENA, Sebastian [FR/FR]; 124, boulevard A. Blanqui, F-75013 Paris (FR). RAMEAU, Philippe [FR/FR]; 22, allée Albert Thomas, F-91300 Massy (FR). CROUZET, Joël [FR/FR]; 12, rue Michel Voisin, F-92330 Sceaux (FR). <b>(74) Mandataire:</b> BECKER, Philippe; Cabinet Becker et Associés, 10, rue de Milan, F-75009 Paris (FR).		<b>(81) Etats désignés:</b> AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).  <b>Publiée</b> <i>Sans rapport de recherche internationale, sera republiée dès réception de ce rapport.</i>
<b>(54) Title:</b> METHOD FOR PREPARING MEMBRANE VESICLES		
<b>(54) Titre:</b> PROCEDE DE PREPARATION DE VESICULES MEMBRANAIRES		
<b>(57) Abstract</b>		
<p>The invention concerns a method for preparing membrane vesicles from a biological sample, characterised in that it comprises at least a step which consists in treating the sample by anion-exchange chromatography and/or gel permeation. The invention is used for preparing original vesicles or of different types, in particular from cells presenting antigens or tumour cells. The invention also concerns the resulting vesicles and their uses.</p>		
<b>(57) Abrégé</b>		
<p>La présente invention concerne un procédé de préparation de vésicules membranaires à partir d'un échantillon biologique caractérisé en ce qu'il comprend au moins une étape de traitement de l'échantillon par chromatographie d'échange d'anions et/ou de perméation de gel. L'invention est utilisée pour la préparation de vésicules d'origines et de natures variées, notamment à partir de cellules présentatrices d'antigènes ou de cellules tumorales. L'invention concerne aussi les vésicules ainsi obtenues et leurs utilisations.</p>		

### UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

## **PROCEDE DE PREPARATION DE VESICULES MEMBRANAIRES**

La présente invention concerne un nouveau procédé pour la préparation (en particulier l'isolement et/ou la purification) de vésicules membranaires. L'invention  
5 concerne également les vésicules membranaires ainsi préparées, ainsi que leurs utilisations biologiques et médicales, par exemple.

Les vésicules membranaires sont des vésicules, d'un diamètre généralement inférieur à 100 nm, composées d'une bicouche lipidique renfermant une fraction  
10 cytosolique. Des vésicules membranaires particulières sont plus spécifiquement issues de compartiments intracellulaires, par fusion avec la membrane plasmique d'une cellule, conduisant à leur libération dans les fluides biologiques ou dans le surnageant de cellules en culture. De telles vésicules sont désignées de manière générale par le terme exosome. Les exosomes possèdent généralement un diamètre  
15 compris entre environ 50 et 90 nm, plus particulièrement entre environ 60 et 80 nm, et portent avantageusement des protéines membranaires (notamment des protéines du complexe majeur d'histocompatibilité) qui sont dans la même orientation que dans la membrane plasmique des cellules dont ils sont issus. Par ailleurs, selon leur origine, les exosomes comportent des protéines membranaires telles que CD40,  
20 CD80, HSP70 et sont dépourvus de réticulum endoplasmique et d'appareil de golgi.

La libération d'exosomes a été mise en évidence à partir de différents types cellulaires, dans des contextes physiologiques variés. Ainsi, il a été montré que les lymphocytes B libèrent des exosomes porteurs de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II, qui jouent un rôle dans la présentation antigénique  
25 (Raposo et al., J. Exp. Med. 183 (1996) 1161). De même, il a été montré que les cellules dendritiques produisent des exosomes (également désignés dexosomes), ayant des caractéristiques structurales et fonctionnelles particulières, et jouant un rôle dans la médiation de la réponse immune, notamment dans la stimulation des lymphocytes T cytotoxiques (Zitvogel et al., Nature Medicine 4 (1998) 594). Il a

aussi été montré que les cellules tumorales sécrètent, de manière régulée, des exosomes particuliers (désignés également texosomes), porteurs d'antigènes tumoraux et capables de présenter ces antigènes ou de les transmettre aux cellules présentatrices d'antigènes (demande de brevet n° WO99/03499). Il est également  
5 connu que les cellules de mastocytes accumulent les molécules dans les compartiments vésiculaires intracellulaires, qui peuvent être sécrétés sous l'effet de signaux (Smith et Weis, Immunology Today 17 (1996) 60). D'une manière générale, il semble donc que les cellules émettent des signaux et communiquent entre elles par l'intermédiaire de vésicules membranaires qu'elles libèrent, qui  
10 peuvent être porteuses de motifs antigéniques, de molécules du CMH, ou de tout autre signal (cytokine, facteur de croissance, etc.), qui présentent des caractéristiques structurales et fonctionnelles spécifiques, et sont produites dans des situations physiologiques différentes. Ces vésicules, et en particulier les exosomes, représentent donc un produit particulièrement intéressant pour des applications  
15 diagnostiques, vaccinales, thérapeutiques ou pour véhiculer des molécules d'intérêt. Il serait donc particulièrement intéressant de disposer d'une méthode efficace et utilisable à l'échelle industrielle, pour préparer des vésicules membranaires compatibles avec un usage biologique, notamment un usage pharmacologique.

20 Les méthodes classiques de préparation des vésicules membranaires (e.g., des exosomes) mettent en oeuvre une série d'étapes de centrifugation différentielle permettant de séparer les vésicules des cellules ou des débris cellulaires présents dans le milieu de culture. Ainsi, les documents cités ci-avant décrivent essentiellement la préparation de vésicules par une série de centrifugations à 300g,  
25 10 000g et 70 000 ou 100 000g, le culot obtenu étant alors repris dans une solution saline, pour constituer une solution concentrée d'exosomes. Cette préparation peut être analysée par des techniques biochimiques classiques permettant d'évaluer la composition protéique des exosomes. Une technique biochimique préférée consiste en une électrophorèse en milieu dénaturant associée à une coloration des protéines

totales ou à la détection de protéines spécifiques à l'aide d'anticorps selon la technique de western blot. La détection des exosomes dans la préparation finale peut être réalisée de façon directe par microscopie électronique après fixation de la préparation par une solution de glutaraldéhyde à 4%.

5

Selon ce procédé, les niveaux de pureté des exosomes sont satisfaisants dans la mesure où de telles préparations ont permis de mettre en évidence l'activité biologique et les propriétés antitumorales dans des modèles animaux. Néanmoins ces procédés antérieurs de préparation par centrifugation ne permettent pas de  
10 séparer finement les vésicules membranaires (e.g., exosomes) des protéines cellulaires ou de certains composants macromoléculaires (ADN, ARN) ou complexes macromoléculaires. Ces procédés n'excluent donc pas la présence d'agents biologiques contaminants non identifiés, incompatibles avec une utilisation thérapeutique chez l'homme. De plus ces étapes sont difficilement extrapolables à  
15 l'échelle industrielle, notamment lorsque des volumes importants doivent être traités, ou pour des applications ex vivo autologues (i.e., patient par patient), où le procédé doit généralement être mis en oeuvre en système confiné.

La présente invention apporte à présent une solution à ce problème.  
20 L'invention décrit en effet de nouveaux procédés permettant la préparation (c'est-à-dire l'isolement et/ou la purification) de vésicules membranaires dans des conditions compatibles avec une utilisation industrielle et des applications pharmacologiques. Ainsi, les procédés de l'invention peuvent être appliqués aussi bien pour des préparations individualisées d'exosomes autologues, que pour des préparations  
25 d'exosomes obtenus à partir de lignées cellulaires établies, en vue d'utilisations expérimentales, biologiques ou à des fins de vaccinations prophylactiques ou thérapeutiques, par exemple.

La présente invention repose plus particulièrement sur l'utilisation de méthodes séparatives par chromatographie pour la préparation de vésicules membranaires, et notamment pour séparer les vésicules membranaires d'éventuelles entités biologiques contaminantes.

5

Plus particulièrement un premier objet de l'invention réside dans un procédé de préparation de vésicules membranaires à partir d'un échantillon biologique caractérisé en ce qu'il comprend au moins une étape de traitement de l'échantillon par chromatographie d'échange d'anions.

10

En effet, la demanderesse a maintenant montré que les vésicules membranaires, notamment les exosomes, pouvaient être purifiés par chromatographie d'échange d'anions. Ainsi, de manière inattendue, il est montré dans la présente demande que les exosomes sont résolus en un pic homogène après  
15 chromatographie par échange d'anions. Ce résultat est tout à fait inattendu dans la mesure où les exosomes sont des objets supramoléculaires complexes composés entre autre d'une membrane entourant un volume interne comportant entre autre des protéines solubles. De plus les exosomes contiennent des protéines membranaires.

20 Un objet plus particulier de l'invention concerne donc un procédé de préparation, en particulier de purification de vésicules membranaires à partir d'un échantillon biologique, comprenant au moins une étape de chromatographie d'échange d'anions.

25 Pour la mise en oeuvre de la présente invention, il peut s'agir d'un échange d'anions fort ou faible, préférentiellement fort. Par ailleurs, dans un mode particulier de mise en oeuvre, la chromatographie est réalisée sous pression. Il peut ainsi s'agir plus particulièrement d'une chromatographie liquide à haute performance (CLHP).

Différents types de supports peuvent être employés pour la réalisation de la chromatographie d'échange d'anions. On peut citer plus préférentiellement la cellulose, le poly(styrène-divinylbenzène), l'agarose, le dextran, l'acrylamide, la silice, le copolymère éthylène glycol-méthacrylate, ou des mélanges, par exemple des mélanges agarose-dextran. A cet égard, on peut mentionner à titre illustratif différents matériels de chromatographie composés de supports tels qu'énoncés ci-dessus, et notamment les gels Source, Poros, Sepharose, sephadex, Trisacryl, TSK-gel SW ou PW, Superdex, Toyopearl HW et sephacryl, par exemple, qui  
10 conviennent pour la mise en oeuvre de la présente invention.

Dans un mode particulier de mise en oeuvre, l'invention concerne donc un procédé de préparation de vésicules membranaires à partir d'un échantillon biologique, comprenant au moins une étape au cours de laquelle l'échantillon biologique est traité par chromatographie d'échange d'anions sur un support choisi  
15 parmi la cellulose, le poly(styrène-divinylbenzène), la silice, l'acrylamide, l'agarose, le dextran, le copolymère éthylène glycol-méthacrylate, seuls ou en mélanges, éventuellement fonctionnalisés.

Par ailleurs, pour améliorer la résolution chromatographique, il est préférable dans le cadre de l'invention d'utiliser des supports sous forme de billes. Idéalement,  
20 il s'agit de billes présentant un diamètre homogène et calibré, et possédant une porosité suffisamment élevée pour permettre la pénétration des objets à chromatographier (i.e., les exosomes). Ainsi, étant donné le diamètre des exosomes (généralement compris entre 50 et 100 nm) il est préférable pour la mise en oeuvre de l'invention d'utiliser des gels de porosité élevée, en particulier comprise entre  
25 environ 10 nm et 5  $\mu$ m, plus préférentiellement entre environ 20 nm et environ 2  $\mu$ m, encore plus préférentiellement entre environ 100 nm et environ 1  $\mu$ m.

Pour la chromatographie d'échange d'anions, le support utilisé doit être fonctionnalisé au moyen d'un groupement capable d'interagir avec une molécule anionique. Généralement, ce groupement est constitué d'une amine pouvant être

ternaire ou quaternaire ce qui définit respectivement un échangeur d'anions faible ou fort.

Dans le cadre de la présente invention, il est particulièrement avantageux d'utiliser un échangeur d'anions fort. Ainsi on utilise préférentiellement selon  
5 l'invention un support de chromatographie tel qu'indiqué ci-dessus, fonctionnalisé par des amines quaternaires. Selon un mode de réalisation plus particulier de l'invention, la chromatographie d'échange d'anions est donc réalisée sur un support fonctionnalisé par une amine quaternaire. Encore plus préférentiellement, il s'agit d'un support choisi parmi le poly(styrène-divinylbenzène), l'acrylamide, l'agarose, le  
10 dextran et la silice, seuls ou en mélanges, fonctionnalisé par une amine quaternaire.

Parmi les supports fonctionnalisés par une amine quaternaire, on peut citer comme exemples les gels Source Q, Mono Q, Q Sepharose, Poros HQ et Poros QE, les gels de type Fractogel TMAE, et les gels Toyopearl Super Q.

15

Un support particulièrement préféré pour la réalisation de la chromatographie d'échange d'anions comprend du poly(styrène-divinylbenzène). Un exemple de ce type de gel utilisable dans le cadre de l'invention est le gel Source Q, notamment Source 15 Q (Pharmacia). Ce support présente l'avantage de pores internes très  
20 larges offrant ainsi peu de résistance à la circulation de liquide à travers le gel, tout en permettant une diffusion rapide des exosomes vers les groupements fonctionnels, paramètres particulièrement importants dans le cas des exosomes étant donné leur taille.

25 L'élution des composés biologiques retenus sur la colonne peut se faire de différentes manières, et en particulier au moyen du passage d'un gradient de concentration croissant d'une solution saline, par exemple de 0 à 2 M. On peut employer notamment une solution de chlorure de sodium, dans des concentrations variant de 0 à 2M, par exemple. La détection des différentes fractions ainsi

purifiées se fait par mesure de leur densité optique (DO) en sortie de colonne au moyen d'une lecture spectro-photométrique en continu. A titre indicatif, dans les conditions utilisées dans les exemples, les fractions comprenant les vésicules membranaires ont été éluées à une force ionique comprise entre 350 et 700 mM environ, selon les types de vésicules.

Différents types de colonnes peuvent être utilisés pour réaliser cette étape chromatographique, selon les besoins et les volumes à traiter. Par exemple, selon les préparations, il est possible d'utiliser une colonne de 100 µl environ jusqu'à 10 ml ou plus. Ainsi, les supports disponibles ont une capacité pouvant atteindre par exemple 25 mg de protéines/ml. De ce fait, une colonne de 100 µl possède une capacité de l'ordre de 2,5 mg de protéines ce qui, compte tenu des échantillons considérés, peut permettre de traiter des sumageants de culture de 2 l environ (qui, après concentration d'un facteur 10 à 20 par exemple, représentent des volumes de 100 à 200 ml par préparation). Il est bien entendu que des volumes supérieurs peuvent également être traités, en augmentant le volume de la colonne par exemple.

Par ailleurs, pour la mise en oeuvre de la présente invention, il est également possible de combiner l'étape de chromatographie d'échange d'anions avec une étape de chromatographie de perméation de gel. Ainsi, selon un mode de mise en oeuvre particulier de l'invention, une étape de chromatographie de perméation de gel est ajoutée à l'étape d'échange d'anions, soit avant, soit après l'étape de chromatographie d'échange d'anions. De préférence, dans ce mode de mise en oeuvre, l'étape de chromatographie de perméation a lieu après l'étape d'échange d'anions. En outre, dans une variante particulière de réalisation, l'étape de chromatographie d'échange d'anions est remplacée par l'étape de chromatographie de perméation de gel. La présente demande montre en effet que les vésicules membranaires peuvent être aussi purifiées en utilisant la chromatographie liquide par perméation de gel, en particulier lorsque cette étape est combinée à une chromatographie d'échange

d'anions ou à d'autre(s) étape(s) de traitement de l'échantillon biologique, comme il sera décrit en détails plus loin.

Pour la réalisation de l'étape chromatographique de perméation de gel, on utilise de préférence un support choisi parmi la silice, l'acrylamide, l'agarose, le dextran, le copolymère éthylène glycol-méthacrylate, ou des mélanges, par exemple des mélanges agarose-dextran. A titre illustratif, pour la chromatographie de perméation de gel, on utilise avantageusement un support tel que le Superdex 200HR (Pharmacia), le TSK G6000 (TosoHaas) ou encore un Séphacryl S (Pharmacia).

10

Le procédé de l'invention peut être mis en oeuvre à partir de différents échantillons biologiques. En particulier, il peut s'agir d'un fluide biologique provenant d'un sujet (moelle osseuse, sang périphérique, etc.), d'un surnageant de culture, d'un lysat cellulaire, d'une solution prépurifiée, ou de tout autre composition comprenant des vésicules membranaires.

15

A cet égard, dans un mode de réalisation particulier de l'invention, l'échantillon biologique est un surnageant de culture de cellules productrices de vésicules membranaires.

Par ailleurs, selon un mode de mise en oeuvre préféré de l'invention, l'échantillon biologique est traité, préalablement à l'étape chromatographique, pour être enrichi en vésicules membranaires (étape d'enrichissement). Ainsi, dans un mode de réalisation particulier, la présente invention concerne un procédé de préparation de vésicules membranaires à partir d'un échantillon biologique caractérisé en ce qu'il comprend au moins :

25

- b) une étape d'enrichissement de l'échantillon en vésicules membranaires, et,
- c) une étape de traitement de l'échantillon par chromatographie d'échange d'anions et/ou par chromatographie de perméation de gel.

Selon un mode préféré de mise en oeuvre, l'échantillon biologique est un surnageant de culture traité de manière à être enrichi en vésicules membranaires. En

particulier, l'échantillon biologique peut être constitué d'une solution prépurifiée obtenue à partir d'un surnageant de culture d'une population de cellules productrices de vésicules membranaires ou d'un fluide biologique par des traitements tels que centrifugation, clarification, ultrafiltration, nanofiltration et/ou chromatographie d'affinité, en particulier par clarification et/ou ultrafiltration et/ou chromatographie d'affinité.

Un procédé préféré de préparation de vésicules membranaires au sens de la présente invention comprend donc plus particulièrement les étapes suivantes:

- a) la culture d'une population de cellules productrices de vésicules membranaires (e.g. d'exosomes) dans des conditions permettant la libération des vésicules,
- b) une étape d'enrichissement de l'échantillon en vésicules membranaires, et,
- c) une étape de traitement de l'échantillon par chromatographie d'échange d'anions et/ou par chromatographie de perméation de gel.

15

Comme indiqué ci-avant, l'étape d'enrichissement de l'échantillon (e.g., du surnageant) peut comprendre une ou plusieurs étapes de centrifugation, clarification, ultrafiltration, nanofiltration et/ou chromatographie d'affinité du surnageant. Dans un premier mode de réalisation particulier, l'étape d'enrichissement comprend (i) une étape d'élimination des cellules et/ou débris cellulaires (étape de clarification), éventuellement suivie de (ii) une étape de concentration et/ou de chromatographie d'affinité. Dans un autre mode de réalisation particulier, l'étape d'enrichissement comprend une étape de chromatographie d'affinité, éventuellement précédée d'une étape d'élimination des cellules et/ou débris cellulaires (étape de clarification). Une phase d'enrichissement préférée selon l'invention comprend (i) une étape d'élimination des cellules et/ou débris cellulaires, (ii) une concentration et (iii) une chromatographie d'affinité.

25

L'élimination des cellules et/ou débris cellulaires peut être réalisée par exemple par centrifugation de l'échantillon à une vitesse faible, de préférence inférieure à 1000g, par exemple comprise entre 100 et 700g. Des conditions préférées de centrifugation lors de cette étape sont de 300g ou 600g environ, pendant une période comprise entre 1 et 15 minutes par exemple.

L'élimination des cellules et/ou débris cellulaires peut également être réalisée par filtration de l'échantillon, éventuellement en combinaison avec la centrifugation décrite ci-dessus. La filtration peut être réalisée en particulier par des filtrations successives au moyen de filtres ayant une porosité décroissante. A cet égard, on utilise préférentiellement des filtres ayant une porosité supérieure à 0,2  $\mu\text{m}$ , par exemple comprise entre 0,2 et 10 $\mu\text{m}$ . On peut utiliser en particulier une succession de filtres ayant une porosité de 10  $\mu\text{m}$ , 1  $\mu\text{m}$ , 0,5 $\mu\text{m}$  puis 0,22 $\mu\text{m}$ .

Une étape de concentration peut également être réalisée, de manière à diminuer les volumes d'échantillon à traiter lors des étapes chromatographiques. Ainsi, la concentration peut être obtenue par centrifugation de l'échantillon à des vitesses élevées, par exemple comprises entre 10 000 et 100 000g, de manière à culotter les vésicules membranaires. A cet égard, il peut s'agir d'une série de centrifugations différentielles, avec la dernière centrifugation effectuée autour de 70 000g environ. Les vésicules membranaires ainsi culottées peuvent ensuite être reprises dans un volume plus faible et dans un tampon approprié pour les étapes ultérieures du procédé.

L'étape de concentration peut également être réalisée par ultrafiltration. Cette ultrafiltration permet en fait à la fois de concentrer le surnageant et d'effectuer une première purification des vésicules. Selon un mode de réalisation préféré, l'échantillon biologique (par exemple le surnageant) est soumis à une ultrafiltration, de préférence une ultrafiltration tangentielle. L'ultrafiltration tangentielle consiste à

concentrer et fractionner une solution entre deux compartiments (filtrat et rétentat), séparés par des membranes de seuils de coupure déterminés. La séparation est réalisée par application d'un flux dans le compartiment retentat et d'une pression transmembranaire entre ce compartiment et le compartiment filtrat. Différents systèmes peuvent être utilisés pour réaliser l'ultrafiltration, comme par exemple des membranes spirales (Millipore, Amicon), membranes planes ou fibres creuses (Amicon, Millipore, Sartorius, Pall, GF, Sepracor). On utilise avantageusement dans le cadre de l'invention des membranes ayant un seuil de coupure inférieur à 1000 kDa, de préférence compris entre 300 kDa et 1000 kDa, encore plus préférentiellement entre 300 kDa et 500 kDa.

L'étape de chromatographie d'affinité peut être réalisée de différentes façons, sur différents matériels et supports chromatographiques. Il s'agit avantageusement d'une chromatographie d'affinité non-spécifique, destinée à retenir certains contaminants présents dans la solution, sans retenir les objets d'intérêt (i.e., les exosomes). Il s'agit donc d'une sélection négative. Il s'agit de préférence d'une chromatographie par colorant, permettant d'éliminer (i.e., de retenir) des contaminants tels que les protéines et enzymes, par exemple l'albumine, des kinases, déshydrogénases, facteurs de coagulation, interférons ou lipoprotéines, ou encore des co-facteurs, etc. Préférentiellement, le support utilisé pour cette chromatographie est un support tel qu'utilisé pour la chromatographie d'échange d'ions, fonctionnalisé avec un colorant. A titre d'exemple spécifique, le colorant peut être choisi parmi le Blue Sepharose (Pharmacia), le Yellow 86, le Green 5 et le Brown 10 (Sigma). Le support est plus préférentiellement de l'agarose. Il est entendu que tout autre support et/ou colorant ou groupe réactif permettant de retenir certains contaminants de l'échantillon biologique traité peuvent être utilisés dans le cadre de la présente invention.

Dans un mode particulier de réalisation de l'invention, l'échantillon biologique est obtenu par traitement d'un surnageant de culture de cellules productrices de vésicules membranaires, par une étape de filtration au moins.

5 Dans un autre mode particulier de réalisation de l'invention, l'échantillon biologique est obtenu par traitement d'un surnageant de culture de cellules productrices de vésicules membranaires, par une étape de centrifugation au moins.

Dans un mode préféré de réalisation de l'invention, l'échantillon biologique est obtenu par traitement d'un surnageant de culture de cellules productrices de vésicules membranaires, par une étape d'ultrafiltration au moins.

10 Dans un autre mode préféré de réalisation de l'invention, l'échantillon biologique est obtenu par traitement d'un surnageant de culture de cellules productrices de vésicules membranaires, par une étape de chromatographie d'affinité au moins.

15 Un procédé préféré de préparation plus particulier de vésicules membranaires au sens de la présente invention comprend les étapes suivantes :

a) la culture d'une population de cellules productrices de vésicules membranaires (e.g. d'exosomes) dans des conditions permettant la libération des vésicules,

20 b) le traitement du surnageant de culture pour produire un échantillon biologique enrichi en vésicules membranaires (e.g. en exosomes) par une étape d'ultrafiltration ou de chromatographie d'affinité au moins, et

c) une étape de traitement de l'échantillon biologique par chromatographie d'échange d'anions et/ou de perméation de gel.

25 Dans un mode préféré de mise en oeuvre, l'étape b) ci-dessus comprend une filtration du surnageant de culture, suivie d'une ultrafiltration, de préférence tangentielle.

Dans un autre mode préféré de mise en oeuvre, l'étape b) ci-dessus comprend une clarification suivie d'une chromatographie d'affinité sur colorant, notamment sur Blue Sepharose..

5 Par ailleurs, après l'étape c), le matériel récolté peut, le cas échéant, être soumis à une ou plusieurs étapes supplémentaires d) de traitement et/ou filtration, notamment dans un but de stérilisation. Pour cette étape de traitement par filtration, on utilise préférentiellement des filtres ayant un diamètre inférieur ou égal à 0,3  $\mu\text{m}$ , encore plus préférentiellement inférieur ou égal à 0,25  $\mu\text{m}$ . De tels  
10 filtres sont par exemple des filtres d'un diamètre 0,22 $\mu\text{m}$ .

Après l'étape d), le matériel obtenu est par exemple distribué dans des dispositifs appropriés tels que flacons, tubes, poches, seringues, etc., dans un milieu approprié de conservation. Les vésicules purifiées ainsi obtenues peuvent être conservées au froid, congelées, ou utilisées extemporanément.

15

Un procédé de préparation particulier au sens de l'invention comprend donc au moins les étapes suivantes :

- c) une étape de traitement de l'échantillon biologique par chromatographie d'échange d'anions et/ou de perméation de gel et,
- 20 d) une étape de filtration, notamment de filtration stérilisante, du matériel récolté après l'étape c).

Dans une première variante de réalisation, le procédé de l'invention comprend :

- 25 c) une étape de traitement de l'échantillon biologique par chromatographie d'échange d'anions, et,
- d) une étape de filtration, notamment de filtration stérilisante, du matériel récolté après l'étape c).

Dans une autre variante de réalisation, le procédé de l'invention comprend :

c) une étape de traitement de l'échantillon biologique par chromatographie de perméation de gel, et,

d) une étape de filtration, notamment de filtration stérilisante, du matériel  
5 récolté après l'étape c).

Selon une troisième variante de réalisation, le procédé de l'invention comprend :

c) une étape de traitement de l'échantillon biologique par  
10 chromatographie d'échange d'anion suivie ou précédée d'une chromatographie de perméation de gel, et,

d) une étape de filtration, notamment de filtration stérilisante, du matériel  
récolté après l'étape c).

15 Les résultats présentés dans les exemples montrent que l'injection d'une préparation d'exosomes dans la colonne de chromatographie permet d'obtenir des pics d'absorption symétriques, qui sont parfaitement résolus (Fig. n°1). Les différentes fractions ainsi isolées sont analysables par des techniques classiques d'électrophorèse des protéines en gel dénaturant suivies de techniques de coloration  
20 par du bleu de Coumassie ou de techniques de détection de protéines spécifiques à l'aide d'anticorps. Il est ainsi possible de montrer, pour des texosomes, que le pic élué en chromatographie d'échange d'anions par une solution saline de 400 mM possède un profil protéique identique à celui d'une préparation d'exosomes classiquement préparée (Fig. n°2). Ceci permet de *facto* de caractériser les pics  
25 élués à des concentrations salines plus faibles ou plus fortes comme relatifs à des entités biologiques distinctes, contaminantes. Dans une autre expérience, les vésicules membranaires produites à partir de cellules dendritiques (dexosomes) ou certaines texosomes sont éluées à une force ionique comprise entre 500 et 700mM environ, et les vésicules de mastocytes aux environs de 350 mM.

En outre, les résultats présentés dans les exemples montrent également que la méthode de l'invention permet de détecter l'éventuelle contamination de la préparation par des protéines majoritaires du milieu de culture telles que la sérum-  
5 albumine bovine. En effet, la chromatographie d'une solution étalon de sérum-albumine bovine dans les conditions précédentes montre que celle-ci donne lieu à un pic élué à une concentration saline distincte de celle des exosomes (Fig. n°3).

Le procédé de l'invention permet donc (i) de purifier des vésicules  
10 membranaires dans des conditions de qualité et de quantité compatibles avec un usage pharmacologique, et (ii) de révéler l'existence d'entités biologiques distinctes et contaminantes au sein de l'échantillon biologique traité.

Le procédé de l'invention peut être appliqué à la préparation de vésicules  
15 membranaires d'origines variées. Ainsi, il peut s'agir en particulier d'exosomes produits par des cellules présentatrices d'antigènes, ou par des cellules tumorales, notamment. En outre, il peut s'agir de cellules primaires, par exemple en culture, ou également de lignées établies, par exemple de lignées immortalisées de cellules productrices de vésicules membranaires. Il peut s'agir de cellules d'origine  
20 mammifère, en particulier d'origine murine ou humaine.

Dans un mode particulier de l'invention, les vésicules membranaires sont des vésicules produites par des cellules présentatrices d'antigènes, notamment des cellules dendritiques, des lymphocytes B, des macrophages et des mastocytes,  
25 éventuellement après sensibilisation de celles-ci à un ou plusieurs antigènes choisis. Une application particulièrement préférée de la présente invention réside dans la préparation de vésicules membranaires produites par des cellules dendritiques. A cet égard, il peut s'agir de cellules dendritiques humaines ou animales, notamment humaines ou murines. Ces cellules peuvent être des cellules primaires, récoltées à

partir de fluides biologiques d'un sujet ou produites ex vivo à partir de cellules précurseur, ou également des cellules de lignées établies, par exemple immortalisées avec un oncogène (EP 701 604).

Un objet particulier de la présente invention réside dans un procédé de  
5 préparation de vésicules membranaires (dexosomes), caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

- a) l'obtention d'une population de cellules dendritiques,
- b) la culture des cellules dendritiques dans des conditions permettant la production de vésicules membranaires (dexosomes) et,
- 10 c) la purification des vésicules membranaires (dexosomes) par un procédé comprenant au moins une étape de chromatographie d'échange d'anions, dans les conditions définies ci-avant.

Un mode de réalisation plus préféré réside dans un procédé de préparation de dexosomes, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes

- 15 a) l'obtention d'une population de cellules dendritiques,
- b) la culture des cellules dendritiques dans des conditions permettant la production de dexosomes,
- c) le traitement du surnageant de culture pour produire un échantillon biologique enrichi en dexosomes, notamment par une étape d'ultrafiltration ou de  
20 chromatographie d'affinité au moins, et,
- d) la purification des dexosomes par un procédé comprenant au moins une étape de chromatographie d'échange d'anions et/ou de perméation de gel, dans les conditions définies ci-avant.

25 Plus particulièrement, pour la mise en oeuvre de cette variante de l'invention, les cellules dendritiques sont préférentiellement obtenues à partir d'un échantillon biologique provenant d'un sujet, par exemple de moelle osseuse ou de sang périphérique.

A cet égard, les techniques de production de cellules dendritiques ont été décrites dans l'art antérieur et peuvent être mises en oeuvre par l'homme du métier (voir notamment les techniques décrites dans la demande WO99/03499, incorporée à la présente par référence). Les cellules dendritiques peuvent ainsi être préparées à partir de cellules souches du système immunitaire, à partir de précurseurs monocytes ou encore isolées directement sous forme différenciée (Revue par Hart, Blood 90 (1997) 3245).

Une méthodologie privilégiée dans le cadre de la présente invention repose sur la production de cellules dendritiques à partir de précurseurs monocytes ou de moelle osseuse. Plus particulièrement, on préfère utiliser dans le cadre de la présente invention des cellules dendritiques obtenues par traitement de précurseurs monocytes (contenus dans le sang ou la moelle) en présence d'une combinaison GM-CSF+IL4 ou GM-CSF+IL-13.

Par ailleurs, pour la mise en oeuvre de la présente invention, il est tout particulièrement avantageux d'utiliser une population de cellules dendritiques comprenant des cellules dendritiques immatures. Avantageusement, on utilise une population de cellules dendritiques composée principalement (i.e., au moins 60%, de préférence 70%) de cellules dendritiques immatures.

L'étape d'obtention des cellules dendritiques peut donc comprendre avantageusement la préparation d'une population de cellules dendritiques comprenant des cellules dendritiques immatures, en particulier d'origine humaine, notamment à partir de précurseurs monocytes, plus particulièrement par traitement avec une combinaison de cytokines telle que GM-CSF+IL-4 ou GM-CSF+IL-13.

Par ailleurs, il est également possible d'utiliser dans le cadre de la présente invention des populations de cellules dendritiques immortalisées. Il peut s'agir de lignées de cellules dendritiques immortalisées (lignée DI par exemple, ou tout autre

lignée produite par exemple par introduction de l'oncogène myc dans les cellules dendritiques). Il peut également s'agir de cellules dendritiques préparées puis immortalisées in vitro. L'intérêt de cellules dendritiques immortalisées réside dans la constitution de banques de cellules sensibilisées à des groupes d'antigènes donnés, utilisables industriellement pour préparer des dexosomes susceptibles d'être administrés à des familles entières de patients.

Pour produire les vésicules membranaires (dexosomes), les cellules dendritiques peuvent être simplement cultivées dans des conditions conventionnelles connues de l'homme du métier. Avantageusement, néanmoins, ces cellules sont cultivées dans des conditions stimulant la production des dexosomes, en particulier en présence de facteurs capables de stimuler la production des dexosomes, notamment d'une cytokine telle que l'interféron gamma, l'interleukine-10 ou l'interleukine-12 (voir par exemple la demande WO99/03499). Dans un mode de mise en oeuvre préféré du procédé de l'invention, les cellules dendritiques sont donc cultivées, au cours de l'étape b) ci-dessus, dans des conditions stimulant la production des vésicules membranaires.

D'autre part, dans une variante particulière de réalisation, les cellules dendritiques sont sensibilisées à un antigène, préalablement à la production des vésicules membranaires. Ce mode de réalisation permet ainsi de charger les cellules dendritiques en antigène(s) particulier(s), de manière à produire des dexosomes ayant un caractère immunogène donné. La sensibilisation peut être réalisée par différentes techniques connues en soi, comprenant par exemple la mise en contact des cellules avec des peptides antigéniques, des antigènes, des complexes protéiques, des cellules ou membranes de cellules exprimant des antigènes, des corps apoptotiques, des vésicules membranaires, des liposomes, des ARN tumoraux ou tout acide nucléique codant pour un ou plusieurs antigènes, déterminants antigéniques ou épitopes (éventuellement véhiculés par un vecteur viral ou non viral), etc (voir par exemple la demande WO99/03499). Dans un mode préféré, la sensibilisation est réalisée par incubation avec des peptides, antigènes, ARN ou

acides nucléiques. Il est entendu que la présente demande n'est pas limitée à des techniques de sensibilisation ou de production des cellules dendritiques.

Une autre application particulièrement avantageuse de la présente invention réside dans la préparation de vésicules membranaires produites par des cellules tumorales, notamment humaines. Il peut s'agir en particulier de toute cellule provenant d'une tumeur solide ou liquide ainsi que de cellules transformées ou immortalisées in vitro. On peut mentionner plus préférentiellement les tumeurs solides, hématopoiétiques ou ascitiques.

10

Une application particulière de la présente invention réside également dans la préparation de vésicules membranaires comprenant une ou plusieurs molécules hétérologues, en particulier recombinantes. Ainsi, il est en effet possible, par exemple, de modifier génétiquement des cellules productrices de vésicules membranaires (par exemple des lignées de mastocytes) pour faire exprimer, dans ou à la surface des vésicules qu'elles produisent, des molécules d'intérêt (PCT/FR99/02691). La présente invention peut également permettre de purifier de telles vésicules modifiées.

De manière plus générale, l'invention peut être appliquée à la préparation de vésicules membranaires produites par tout type cellulaire, en particulier de vésicules de type exosome, ayant de préférence un diamètre inférieur à environ 100 nm. Il peut s'agir notamment de cellules de macrophages, mastocytes, réticulocytes, etc. Dans la section expérimentale, nous avons utilisé des préparations d'exosomes provenant (i) de lignées cellulaires telles que des lignées de cellules tumorales (TS/A), des lignées de cellules dendritiques murines (DI), une lignée de mastocytes (RBL) et (ii) de cellules dendritiques humaines dérivées de monocytes. Les résultats obtenus sont directement transposables à d'autres cultures primaires telles que des cellules tumorales, des cellules dendritiques humaines, des lymphocytes B, etc.,

cultivables dans des conditions industriellement acceptables. Le procédé de l'invention peut ainsi être mis en oeuvre comme étape de purification des exosomes dans le cadre de leur utilisation en thérapeutique humaine.

5 Les vésicules membranaires ainsi obtenues constituent, selon leur origine, des outils d'étude des cancers ou de la régulation du système immunitaire, de transfert de molécules, de production d'anticorps, de marquage, de diagnostic, de constitution de banques, des principes de vaccin ou de médicament, etc.

10 En outre le procédé de l'invention peut également être utilisé comme méthode pour un contrôle de qualité sur la présence éventuelle de contaminants (notamment de protéines contaminantes) dans le milieu de culture ou dans des préparations de vésicules membranaires.

15 A cet égard, la présente invention peut donc être mise en oeuvre aussi bien dans une méthode préparative de vésicules membranaires que dans un système analytique permettant de contrôler la qualité d'une préparation de vésicules membranaires, quelle que soit leur méthode de préparation.

20 La présente invention concerne donc également un procédé de contrôle de la présence de contaminants, notamment d'origine protéique ou nucléique, dans une préparation de vésicules membranaires, notamment d'exosomes, comprenant le traitement d'une fraction de ladite préparation par une étape au moins de chromatographie d'échange d'anions, et la mise en évidence de la présence de  
25 contaminants.

L'invention concerne aussi, de manière générale, l'utilisation de la chromatographie d'échange d'anions, en particulier de type liquide à haute performance, pour la préparation ou la purification de vésicules membranaires. Elle

concerne l'utilisation de la chromatographie d'affinité pour la préparation ou la purification de vésicules membranaires.

L'invention a encore pour objet les vésicules membranaires préparées par le procédé de l'invention, ainsi que toute composition comprenant de telles vésicules.

5

La présente invention sera plus complètement décrite à l'aide des exemples qui suivent qui doivent être considérés comme illustratifs et non limitatifs.

### **Légende des figures**

10

Figure no 1 : Profil d'élution après chromatographie par échange d'anions d'un échantillon d'exosomes préparés par centrifugation différentielle.

Figure no 2 : Analyse du profil protéique des différentes fractions d'élution d'une préparation d'exosomes par électrophorèse en SDS PAGE puis coloration par du bleu de Coomassie.

15

Figure no 3 : Profil d'élution après chromatographie par échange d'anions d'une solution étalon de sérum-albumine bovine.

Figure no 4 : Schéma de traitement d'un échantillon biologique comprenant des vésicules membranaires par ultrafiltration tangentielle.

Figure n° 5 : Profil général de l'étape de Blue sepharose 6 fast flow après les centrifugations à 600 et 10 000 g d'un surnageant de dexosomes.

20

Figure n° 6 : Western blot dirigé contre les molécules du CMH II des exosomes, dans la fraction non adsorbée et dans l'éluat, de l'étape de Blue sepharose 6 fast flow.

Figure n° 7 : Profil général de l'étape source 15Q après une étape de Blue sepharose fast flow.

25

Figure n° 8 : Détails du gradient d'élution sur la source 15Q après une étape de Blue sepharose 6 fast flow (agrandissement de la zone rectangulaire en bas à droite dans la figure 7).

Figure n°9 : Exemple de profil de purification d'exosomes produits à partir de la lignée RBL DR+ (équivalent de 53 µg de protéines) par une colonne de Source 15Q après traitement par la DNase et la RNase.

Figure n°10 : Séparation des exosomes par un gradient discontinu en NaCl sur un support Source 15Q.

Figure n°11 : Western blot dirigé contre les molécules du CMH II humain de chaque pic séparé par CLHP et ultracentrifugé. Témoin positif : Cellules dendritiques humaines exprimant les molécules du CMH II. Témoin négatif : milieu ultracentrifugé et représentant le bruit de fond. MW= poids moléculaire ; NA= fraction non adsorbé.

## **Techniques générales de culture cellulaire et de biologie moléculaire**

### **1) Cultures cellulaires**

La lignée de cellules TS/A est une lignée de cellules murines établie à partir d'un carcinome mammaire spontané. Cette lignée est cultivée à 37°C en présence de 5% de CO<sub>2</sub> en milieu RPMI en présence de 10% de sérum de veau foetal (Dominique Dutcher).

Les lignées de cellules dendritiques sont maintenues dans un milieu IMDM contenant 10% de sérum bovin foetal inactivé, 2 mM de L-glutamine, 50 µM de 2-βME, 100 UI/ml de pénicilline, et 100 µg/ml de streptomycine.

### **2) Analyse des protéines par SDS PAGE**

20µl d'échantillon est dilué dans le tampon de Laemmli (Nature 227 (1970) p680-685) puis soumis à une dénaturation thermique à 95°C pendant 10 mn puis

chargé sur des gels d'acrylamide 10% (Novex 1 mmxl 0 puits). Après migration, les gels sont colorés au bleu de Coomassie.

### **Exemples**

5

**1) Chromatographie par échange d'anions d'une préparation d'exosomes produits par des cellules tumorales (lignée TS/A) : analyse par SDS PAGE du profil protéique des différentes fractions éluées.**

10

Cet exemple illustre comment une étape de chromatographie d'échange d'anions peut permettre de séparer des impuretés d'une préparation d'exosomes.

#### **1. 1) Protocole**

15

Dans cette expérience le matériel de départ est constitué d'un concentrat d'exosomes préparés par centrifugation différentielle à partir d'un surnageant de culture de cellules TS/A permettant de séparer les exosomes des cellules ou des débris cellulaires présents dans le milieu de culture. La première centrifugation est réalisée à basse vitesse (300g pendant 5 mn) afin de culotter les cellules en suspension présentes dans le surnageant de culture. Deux autres centrifugations (1200g pendant 20 mn puis 10 000g pendant 30 mn) permettent de culotter les débris cellulaires. Le surnageant ainsi clarifié est alors soumis à une ultracentrifugation à haute vitesse de 70 000g pendant 1 heure permettant de culotter les exosomes. Cette préparation est alors lavée dans un grand volume de solution saline pour être recentrifugée dans les conditions précédentes. Le culot est alors repris dans un volume d'environ 100 µl de solution saline et constitue une solution concentrée d'exosomes. La quantité de protéines est mesurée par la technique de Bradford (Biorad, Ivry, France). Ce concentrat présente une teneur en protéines totales comprise entre 500 et 1000 µg/ml.

25

40 µg de cette préparation d'exosomes dilués dans 500 µl de tampon Tris/HCL 50 mM pH sont injectés sur une colonne contenant du gel Source Q 15 (Pharmacia) équilibré dans une solution Tris/HCL 50 mM pH 8. Après rinçage, les espèces adsorbées sont éluées sur 30 volumes de colonne par un gradient linéaire de NaCl de 0 à 500 mM, puis par une solution de NaCl 2M. Les fractions d'élution sont analysées par spectrophotométrie à 260 et 280 nm. Les fractions d'élution sont regroupées en 5 cinq fractions majeures (de F1 à F5) afin de pouvoir analyser leur profil protéique respectif. Les protéines de chaque fraction sont précipitées par 1/10 de volume, d'une solution d'acide trichloroacétique à 100 % puis rincées par une solution d'acétone. Les culots protéiques sont repris dans 20 µl de solution de Laemmli, et sont déposés sur un gel d'acrylamide SDS PAGE qui est alors coloré par du bleu de Coomassie.

## 1.2) Résultats

15

Les profils d'élution à 260 et 280 nm sont représentés sur la figure 1. Les profils montrent la présence de 3 pics symétriques distincts, élués aux concentrations salines respectives de 105 mM, 400 mM et 2 M de NaCl.

L'analyse du profil protéique des fractions correspondant aux différents pics montre que le pic élué à 400 mM de NaCl possède un profil protéique identique à celui d'une préparation d'exosomes préparée classiquement par centrifugation (Figure N° 2). Le rapport entre les absorptions à 260 et 280 nm mesuré à une valeur de 0.8 est compatible avec celui décrit dans le cas des protéines.

Le pic élué (fraction F2) à 105 mM de NaCl présente en revanche un profil protéique différent montrant seulement deux bandes distinctes. Les mesures d'absorbance à 260 et 280 nm donnent un rapport de 1.6 suggérant la présence d'une association d'acides nucléiques et de protéines.

La fraction F5 élue à 2 molaire de NaCl correspond aux composés biologiques fortement associés à la colonne.

Il est donc possible de séparer les exosomes d'impuretés par une étape d'échange d'anions.

**2) Chromatographie par échange d'anions d'une solution étalon de  
5 sérum-albumine bovine :**

Cette technique de chromatographie par échange d'anions permet également d'évaluer le degré de contamination d'une préparation d'exosomes par les protéines présentes dans le milieu de culture. Ainsi, nous montrons en chromatographiant 10  
10 µg d'une solution de sérum albumine bovine, correspondant à la protéine majoritaire du milieu de culture, que celle-ci est éluée à 205 mM de NaCl sous forme d'un pic étroit distinguable des pics précédemment décrits dans le cas des exosomes.

**3) Traitement d'un surnageant de culture contenant des exosomes par  
15 ultrafiltration.**

Cet exemple montre qu'il est possible de concentrer les exosomes par ultrafiltration. De plus, la préparation exosomale est appauvrie en protéine contaminantes telle que les BSA.

20

**3.1) Protocole : (Figure N° 4)**

150 ml d'un surnageant de culture de cellules obtenu après centrifugation à 300 g de cellules TSA, sont soumis à une filtration sur un filtre de porosité de 0.22 µm  
25 (Millipore). Le filtrat est dilué de moitié dans du PBS. Les 300 ml résultants sont filtrés tangentiellement avec une cassette de filtration (10cm<sup>2</sup> de membrane) d'un seuil de coupure de 300 000 D (Sartorius).

**3.2) Résultats**

7 ml de rétentat sont obtenus après 1 heure de filtration. Le rétentat a été soumis une ultracentrifugation (79 000) pour culotter et analyser les exosomes. Une analyse par SDS-PAGE suivie de coloration au bleu de Coomassie a révélé que l'échantillon contenait significativement moins de BSA que la solution qui a été ultrafiltrée. De plus, des bandes protéiques spécifiques des exosomes produits à partir de TSA sont observées.

L'ultrafiltration peut donc être utilisée dans un procédé de purification d'exosomes afin de séparer ceux-ci de protéines contaminantes.

10

#### **4) Purification par CLHP d'exosomes humains, produits par des cellules dendritiques humaines dérivées de monocytes (MDDC).**

##### **4.1) Matériels et Méthodes**

15

. Tampons et solutions mères.

On travaille à partir de solutions mères filtrées 0,22 µm à l'exception de l'eau et de la solution de soude. Le premier tampon est une solution de Bis-Tris-Propane (BTP) 100 mM (Sigma, 99% de pureté), tamponnée à pH 6, ce tampon est branché sur la voie A du chromatographe (BioCad Sprint, Perkin-Elmer). Le second tampon est une solution de Bis-Tris-Propane 100 mM, tamponnée à pH 9, ce tampon est branché sur la voie B du chromatographe. L'eau est produite sur résine par un système Milli-Q à une résistance de 18 MΩcm. l'eau est branchée sur la voie C. Sur la voie D est branchée une solution mère de chlorure de sodium (NaCl, Prolabo, 99,5% de pureté) 3 M. Sur la voie F est branchée une solution de soude (NaOH, Prolabo, 98% de pureté minimum) 0,1 M. La voie E est utilisée pour charger les surnageants de culture sur les colonnes.

Tous les tampons sont réalisés à partir de l'eau produite par le système Milli-Q, les tampons ne sont pas dégazés.

#### . Colonnes

5

Blue Sepharose 6 fast flow (pharmacia):

La première étape est réalisée avec une colonne de Blue Sepharose 6 fast flow (Pharmacia). La matrice est de l'agarose couplé avec du Blue sepharose 6 fast flow Blue 3G (7%). La taille des particules se situe entre 45 et 165  $\mu\text{m}$ . Le débit linéaire maximum est de 750 cm/hr. Le gel est stable aux pH compris entre 4 et 12, aux pH extrêmes, 2 et 14, le gel peut être endommagé ce qui entraîne une diminution de la capacité de fixation (découplage du Blue sepharose 6 fast flow) et une augmentation de la pression (formation de fines).

Le Blue sepharose 6 fast flow est spécifique de composants comme l'albumine, les kinases, les déshydrogénases et d'autres enzymes contenant des cofacteurs comme le  $\text{NAD}^+$ , des facteurs de coagulation, des interférons et de lipoprotéines.

La capacité théorique de fixation du Blue sepharose 6 fast flow est d'environ 15 à 20 mg de sérum albumine par ml de gel.

Le volume de colonne utilisé est d'environ 5,5 ml de gel (C10/10, Pharmacia) soit une capacité théorique de 80 à 110 mg de sérum albumine. Le débit utilisé est de 2 ml/min (150 cm/hr) sur le BioCad Sprint et de 3,5 ml/min (260 cm/hr) avec un système de détection Pharmacia. La pression n'excède pas 2.5 bars et est essentiellement due aux cellules de mesure de DO

25 Source 15Q :

La deuxième étape est réalisée avec une colonne de Source 15Q (pharmacia), échangeur d'anions fort. La matrice est du polystyrène réticulé avec du divinylbenzène. La taille des billes est de 15  $\mu\text{m}$  et est homogène. Les billes sont parcourues par un réseau de pores avec une taille variant de 20 à 1000 nm. Ces gels

sont très résistant à la pression et acceptent des débits linéaires important (1800 cm/hr et plus) tout en gardant une résolution et une capacité satisfaisante. Cela est rendu possible grâce à l'homogénéité des billes et à leur porosité qui augmentent l'accès des molécules aux groupements fonctionnels.

- 5 Le gel est stable aux pH compris entre 2 et 12 au delà le gel risque de subir d'important dommages qui diminuent ses capacités.

La capacité théorique de fixation de cet échangeur est d'environ 25 mg de protéines par ml de gel. On utilise une colonne de 0,8 ml (PEEK column 4,6 mm ID/50 mm L, Perkin-Elmer), soit une capacité maximum de 20 mg de protéines. La capacité  
10 réelle, qui permet de garder une bonne résolution, est de l'ordre de 10% de cette capacité maximum soit 2 mg de protéines. Le débit utilisé est de 5 ml/min (1880 cm/hr) et permet des séparations rapides. La colonne est packéé avec le système Poros selfPack à 15ml/min à 150 bars.

15 . Chromatographe (BioCad Sprint)

Le BioCad est un système CLHP (Chromatographie Liquide Haute Performance) qui permet de travailler à des hautes pressions (maximum 204 bars) et à des débits s'étalant de 0,2 à 60 ml/min. On peut brancher jusqu'à 6 tampons (les 6 voies sont  
20 utilisées actuellement), et le système peut être traité par la soude 0.1 M (pH 12) pour la dépyrogénéisation des tubulures et de la colonne.

Les séparations peuvent être réalisées à température ambiante ou à 4°C. Les échantillons sont chargés soit par une des voies accessibles ou par des boucles d'injection pour les petits volumes (de 100 µl à 5 ml). Le système de détection  
25 utilise une cellule UV double voie : de 190 à 450 nm pour UV et de 366 à 700 nm pour le visible. Classiquement on utilise une détection à 254 nm pour les acides nucléiques et une détection à 280 nm pour les protéines (ceux sont les acides aminés avec un cycle benzène tels les tyrosines, tryptophanes et phénylalanines qui absorbent). Le système est entièrement contrôlé par informatique (logiciel

développé par Perspective biosystem). Pour chaque séparation, tous les paramètres (pression, débit, conductivité, densité optique, pH, etc.) peuvent être contrôlés.

Enfin, l'échantillon séparé est soit récupéré en tube Falcon 50 ml ou collecté en tubes eppendorf siliconés (collecteur Advantec SF-2120) pour minimiser les interactions non spécifiques.

. Production des exosomes à partir de cellules dendritiques.

De façon première, les cellules dendritiques sont obtenues à partir de précurseurs monocytaires du sang périphérique. Les monocytes isolés sont cultivés en présence d'une combinaison de GM-CSF et d'IL-13 ou d'IL-4 (voir les techniques décrites dans la demande WO99/03499). Pour la production d'exosomes il est préférable d'utiliser une population de cellules dendritiques immatures.

#### **4.2) Etape de Blue Sepharose 6 fast flow.**

Les surnageants de culture sont centrifugés deux fois à 600 g et une fois à 10 000 g avant d'être chargés sur la colonne de Blue sepharose 6 fast flow.

On utilise une colonne de 5,5 ml, le débit est de 2 ml/min (débit linéaire de 150 cm/h, temps de contact de 2,7 min), la pression est de l'ordre de 2,5 bars (fig 5). La colonne est équilibrée en tampon BTP 12 mM, 150 mM NaCl et pH 7. Après équilibration, le surnageant est chargé sur la colonne puis celle ci est lavée avec le même tampon d'équilibration jusqu'à la redescende de la D.O. L'élution des protéines fixées est réalisée en BTP 12 mM, NaCl 1,5 M et pH 7 (en 3 à 4 volumes de colonne). La colonne est régénérée par passage d'eau (2 à 3 volumes de colonne), puis on passe 2 volumes de soude 0,1 M (pH 12), enfin, la colonne est rééquilibrée en BTP 12 mM, 150 mM NaCl et pH 7.

Aspect quantitatif et qualitatif de l'étape de Blue sepharose 6 fast flow :

Comme décrit avant, l'étape de Blue sepharose 6 fast flow est spécifique des protéines comme l'albumine qui est un contaminant majeur du surnageant de culture. On mesure la concentration protéique de chaque fraction de l'étape de Blue sepharose 6 fast flow par une technique Biorad (mesure d'une DO à 600 nm). Les résultats sont rassemblés dans le tableau 1.

Tableau 1. Concentrations protéiques dans chaque fraction de l'étape de Blue sepharose 6 fast flow.

	surnageant	Non adsorbé	Pic d'élution	Pic régénération
Concentration protéique (mg/ml)	3.69	0.18	3.32	1.48
Volume (ml)	25	37.5	20	20
quantité totale de protéines(mg)	92.2	6.7	66.4	29.6
Rendements (%)	100	7.3	72	32.1

La majeure partie des protéines se retrouve soit dans l'éluat (72%) ou dans la régénération (32%). La fraction non adsorbée ne représente que 7 à 10% du total des protéines chargées sur la colonne de Blue sepharose 6 fast flow. L'étape est spécifique des contaminants majeurs du surnageant. Pour vérifier cette spécificité du Blue sepharose 6 fast flow, chaque fraction est déposée sur un gel SDS-PAGE en condition réductrice et coloré en nitrate d'argent. La surcharge de la colonne (50 ml de surnageant chargés sur une colonne de Blue sepharose 6 fast flow de 5.5 ml) a permis de calculer la quantité maximum de protéines, du surnageant de culture, qu'il est possible de charger sur la colonne par ml de gel (tableau 2). Dans ce cas le

pourcentage de la fraction non adsorbée passe de 7 à plus de 30% de la quantité de protéine chargée. Cette valeur est comprise entre 16 et 18 mg de protéines par ml de gel Blue sepharose 6 fast flow. En conclusion 1 ml de gel de Blue sepharose 6 fast flow permet de purifier environ 5 à 6 ml de surnageant de culture (AIMV 2.5% de HSA). Cette valeur prend toute son importance pour l'étude du scale up puisqu'il détermine la taille de la colonne à utiliser et par conséquent le coût de cette étape.

Tableau 2. Etude de la surcharge du support Blue sepharose 6 fast flow en première étape.

	surnageant	Non adsorbé	Pic d'éluion	Pic régénération
Concentration protéique (mg/ml)	3.02	0.87	3	1.56
Volume (ml)	50	60	20	20
quantité totale de protéines(mg)	151	52.2	60	31.2
Rendements (%)	100	34.6	39.7	20.6

10

Comme attendu, le contaminant majeur des surnageants de culture, après les centrifugations à 600 et 10 000 g, est l'albumine. Ce contaminant est retrouvé, après fixation sur le Blue sepharose 6 fast flow, dans les fractions eluat et régénération. En plus de ce contaminant, on retrouve de nombreux autres contaminants de bas poids et hauts poids moléculaires.

15

L'étape de Blue sepharose 6 fast flow permet l'élimination d'environ 90 à 95% des contaminants du surnageant de culture. Les exosomes sont dans la fraction non adsorbée du Blue sepharose 6 fast flow (fig.6).

20

#### 4.3) Etape d'échangeur d'anions: source 15Q (Pharmacia).

On utilise une colonne de source 15Q de 0.8 ml avec un débit de 5 ml/min (débit linéaire de 1880 cm/h, temps de contact 0,1 min) avec une pression de l'ordre de 50 bars. La fraction non adsorbée du Blue sepharose 6 fast flow est  
5 directement chargée sur la source 15Q (fig. 7) sans modifications de la concentration saline (NaCl) ou du pH.

Après l'étape de fixation la colonne est lavée en tampon BTP 12 mM, 280 mM NaCl à pH 7 (35 volumes de colonne) jusqu'à la redescende de la DO à des valeurs  
10 proches de 0. On fait une seconde étape de lavage à une concentration saline de 150 mM NaCl (10 volumes de colonne) pour renforcer les interactions des exosomes avec le support.

On réalise un premier gradient de 150 à 420 mM NaCl en 7 volumes de colonne (fig.8) puis le gradient est stoppé pendant 9 volumes de colonne. Le second gradient  
15 démarre de 420 mM NaCl jusqu'à 1 M NaCl en 25 volumes de colonne. Les exosomes sont élués dans ce second gradient dans deux pics à 550 et 700 mM NaCl (fig.8). La colonne est régénérée par passage de 10 volumes de colonne d'eau puis par 10 volumes de colonne de soude 0.1 M (pH 12) et enfin par passage de 10 volumes de colonne de NaCl 3M. La colonne est ensuite équilibrée en tampon BTP  
20 12 mM, 150 mM NaCl, pH 7.

#### Aspects quantitatifs et qualitatifs de l'étape de source 15Q.

Comme on peut le voir sur la figure 6 la majeure partie des protéines, de la fraction  
25 non adsorbée du Blue sepharose 6 fast flow, ne sont pas retenues par la colonne. Les concentrations protéiques ont été mesurées par un test Biorad (absorption de la DO à 600 nm) et sont résumées dans le tableau 3.

Tableau 3. aspects quantitatifs de l'étape de Source 15Q après une étape de Blue sepharose 6 fast flow.

	Départ (non adsorbé Blue sepharose 6 fast flow)	Non adsorbé source 15Q	Eluat fractions 4 à 6	Eluat fractions 19 à 23
Protéines (mg/ml)	0.17	0.14	0.01	0.02
Volume (ml)	85	98	3	5
Protéines totales (mg)	14.45	13.72	0.03	0.10
Rendements (%)	100	94.9	0.2	0.8

95% des protéines chargées sur la colonne Source 15Q ne sont pas retenues. Les fractions poolées 4 à 6 et les fractions poolées 19 à 23 représentent environ 1.5%. La régénération n'a pas été dosée. Le rendement est très proche de 100% : l'ensemble des protéines et des vésicules chargées sont éluées de la colonne. En terme de charge protéique de la colonne, la Source 15Q est capable de fixer environ 25 mg de protéines (données constructeur), soit pour les 0.8 ml, 20 mg de protéines. Il est clair que l'on est très loin du maximum de la colonne et des 5 à 10% en accord avec une bonne résolution, puisque ces valeurs se situent entre 1 et 2 mg de protéines. Dans ces conditions on peut purifier, avec une colonne de 0.8 ml de Source 15Q, entre 200 et 400 ml de surnageant de culture.

Chaque pic d'élution est ultracentrifugé (100 000 g pendant 1 heure) et poolé pour être observé en microscopie électronique. Le premier pic (elué entre 150 et 420 mM NaCl) contient essentiellement des protéines, des débris cellulaires et quelques vésicules marquées par un anticorps anti CMH II.

Le second pic (élué à 550 mM NaCl), traité de la même façon, montre un bruit de fond moins important, un nombre beaucoup plus grand de vésicules marquées par un anticorps anti CMH II, il existe également une hétérogénéité dans la taille des vésicules.

- 5 Le troisième pic (élué à 700 mM NaCl) ne présente plus de bruit de fond, les vésicules sont pratiquement toutes marquées par un anticorps anti CMH II et sont beaucoup plus homogènes en taille.

Ces deux fractions (pic 2 et 3) sont à comparer à ce que l'on obtient par le procédé classique de purification par ultracentrifugation. Dans ce cas on observe un bruit de  
10 fond important et une grande hétérogénéité des vésicules comparé aux deux pics de chromatographie. De plus, il semble qu'il existe une séparation entre les débris et les exosomes purifiés par CLHP ce qui n'est pas le cas avec l'ultracentrifugation.

#### 4.4) Conclusions

15

En deux étapes de chromatographie, la première faisant appel à une sélection négative (étape de Blue sepharose 6 fast flow) des exosomes la seconde faisant appel à une sélection positive et à une élution sélective des exosomes (étape de Source 15Q), on enlève environ entre 99 et 99.5% des protéines du surnageant de  
20 culture tout en gardant les exosomes. Le procédé conserve l'intégrité des exosomes par microscopie électronique. Ce procédé est donc spécifique pour la purification des exosomes.

A titre d'exemple, d'autres colonnes retenant les protéines du sérum peuvent être utilisées. Par ailleurs, des colonnes macroporeuses cationiques peuvent être utilisées  
25 à la place de la Source 15Q.

#### 5) Purification par CLHP d'exosomes produits à partir de la lignée RBL (Rat Basophilic Leukemia).

Les exosomes sont produits à partir d'une lignée RBL (Rat Basophilic Leukemia) transfectée de façon stable pour exprimer, à la membrane des exosomes, des molécules du CMH II humain (PCT/FR99/02691). Après induction, par un ionophore (ionomycine), les cellules dégranulent et relarguent des exosomes dans un milieu sans protéines (RPMI). Après élimination des cellules par centrifugation à 600 g 10 min les surnageants sont récupérés et traités avec une DNase (Sigma) et une RNase (Sigma).

Les surnageants traités sont ensuite centrifugés à 10 000 g à 37°C, 30 min, puis à 100 000 g pendant 1 heure.

Le culot d'ultracentrifugation est chargé sur une colonne d'échange d'ions, Source 15Q, Pharmacia (fig.9). On utilise une colonne de 0.8 ml avec un débit de 5 ml/min (débit linéaire 1880 cm/h, temps de contact 0.1 min).

La colonne est équilibrée en tampon Bis-Tris-Propane (BTP) 12 mM, 150 mM NaCl et pH 7. Après chargement de l'échantillon la colonne est lavée avec 15 à 20 volumes de colonne du même tampon d'équilibration. L'élution est réalisée avec 25 volume de colonne en faisant varier la concentration saline de 150 mM à 1 M NaCl, le pH est maintenu constant (fig.9). Le milieu est très peu contaminé par des protéines puisque les cellules sont lavées dans du PBS et l'induction ainsi que le relargage des exosomes se fait dans du RPMI seul. Ceci est confirmé par la faible absorption observée (280 et 254 nm) dans la fraction non adsorbée de la Source 15Q. La présence des exosomes est confirmée par un western blot dirigé contre les molécules du CMH II (fig 11) après séparation des pics par des steps en NaCl (fig. 10) et ultracentrifugation de chacun des pics.

On observe 3 pics, plus une fraction non adsorbée : un premier pic élué à 350 mM NaCl, un deuxième pic élué à 700 mM NaCl et enfin un troisième pic élué à 1.5 M NaCl. Le pic à 700 mM est majoritaire. En western blot dirigé contre les molécules du CMH II humain on retrouve un signal dans les pics 1 (350 mM NaCl) et dans le pic 2 (700 mM NaCl).

Il est à noter que le pic 1 qui a une intensité de signal, en protéines, 7 à 8 fois moindre que le pic 2 présente un signal en western blot équivalent à celui du pic 2. Ceci peut traduire une plus grande pureté du pic 1. Pour confirmer ce fait, les pics ont été ultracentrifugés et observés en microscopie électronique.

- 5 Le pic 1 est très riche en exosomes marquées par un anticorps anti CMH II humain, il y a peu ou pas de bruit de fond. Les exosomes sont hétérogènes en taille, il ne semble pas y avoir de séparation des exosomes pas leur taille mais par un mécanisme spécifique de compétition entre l'éluant (NaCl) et les exosomes.

Les fractions comprises entre les deux pics ont été analysées par microscopie  
10 électronique. On y trouve peu d'exosomes avec un bruit de fond plus important que dans le pic 1.

Le pic 2 est très semblable aux fractions comprises entre les deux pics, on retrouve peu d'exosomes et bruit de fond plus important.

## 15 **Conclusions**

La Source 15Q est capable de retenir les exosomes et de les séparer de contaminants éventuels (fig.9). La très grande majorité des exosomes est éluée dans un même pic à 350 mM NaCl. En microscopie électronique les exosomes apparaissent  
20 «normaux» avec un marquage spécifique des molécules du CMH II humain. L'hétérogénéité de la taille des exosomes (pic 1) semble indiquer que la séparation est basée sur des échanges ioniques et non sur un tamisage. Le Source 15Q peut donc être utilisé comme étape de purification des exosomes de RBL.

## REVENDICATIONS

1. Procédé de préparation de vésicules membranaires à partir d'un échantillon biologique caractérisé en ce qu'il comprend au moins une étape de traitement de l'échantillon par chromatographie d'échange d'anions.  
5
2. Procédé selon la revendication 1, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une étape de chromatographie d'échange d'anions fort.
- 10 3. Procédé selon l'une des revendications 1 et 2, caractérisé en ce qu'il comprend au moins une étape de chromatographie d'échange d'anions et de perméation de gel.
4. Procédé selon l'une des revendications précédentes, caractérisé en ce que l'échantillon biologique est un fluide biologique, un surnageant de culture, un lysat  
15 cellulaire ou une solution prépurifiée.
5. Procédé de préparation de vésicules membranaires à partir d'un échantillon biologique caractérisé en ce qu'il comprend au moins:
  - b) une étape d'enrichissement de l'échantillon en vésicules membranaires, et,
  - 20 c) une étape de traitement de l'échantillon par chromatographie d'échange d'anions et/ou par chromatographie de perméation de gel.
6. Procédé selon la revendication 5, caractérisé en ce qu'il comprend
  - a) la culture d'une population de cellules productrices de vésicules  
25 membranaires (e.g. d'exosomes) dans des conditions permettant la libération des vésicules,
  - b) une étape d'enrichissement de l'échantillon en vésicules membranaires, et,
  - c) une étape de traitement de l'échantillon par chromatographie d'échange d'anions et/ou par chromatographie de perméation de gel.

7. Procédé selon les revendications 5 ou 6, caractérisé en ce que l'étape d'enrichissement comprend une étape de clarification, éventuellement suivie d'une étape de concentration.

5

8. Procédé selon l'une des revendications 5 à 7, caractérisé en ce que l'étape d'enrichissement comprend une étape de chromatographie d'affinité, de préférence sur colorant.

10 9. Procédé selon la revendication 7 ou 8, caractérisé en ce que l'étape d'enrichissement comprend une étape de centrifugation à faible vitesse et/ou une filtration.

15 10. Procédé selon l'une des revendications 7 à 9, caractérisé en ce que l'étape d'enrichissement comprend au moins une étape d'ultrafiltration, notamment tangentielle.

11. Procédé de préparation de vésicules membranaires, caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

20 a) la culture d'une population de cellules productrices de vésicules membranaires (e.g. d'exosomes) dans des conditions permettant la libération des vésicules,

b) le traitement du surnageant de culture pour produire un échantillon biologique enrichi en vésicules membranaires (e.g. en exosomes) par une étape  
25 d'ultrafiltration ou de chromatographie d'affinité au moins, et

c) une étape de traitement de l'échantillon biologique par chromatographie d'échange d'anions et/ou de perméation de gel.

12. Procédé selon la revendication 11, caractérisé en ce qu'il comprend en outre une étape d) de filtration du matériel récolté.

13. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les vésicules membranaires possèdent un diamètre compris entre 60 et 90 nm environ.

14. Procédé selon l'une quelconque des revendications précédentes, caractérisé en ce que les vésicules membranaires sont des vésicules produites par des cellules présentatrices d'antigènes, notamment des cellules dendritiques, des lymphocytes B, des macrophages ou des mastocytes.

15. Procédé selon la revendication 14, caractérisé en ce que les vésicules membranaires sont des vésicules produites par des cellules dendritiques, notamment humaines.

16. Procédé selon l'une des revendications 1 à 13, caractérisé en ce que les vésicules membranaires sont des vésicules produites par des cellules tumorales, notamment humaines.

20

17. Procédé de préparation de vésicules membranaires caractérisé en ce qu'il comprend les étapes suivantes:

- a) l'obtention d'une population de cellules dendritiques,
- b) la culture des cellules dendritiques dans des conditions permettant la production de vésicules membranaires et,
- c) la purification des vésicules membranaires par un procédé comprenant au moins une étape de chromatographie d'échange d'anions.

18. Procédé de préparation de vésicules membranaires, caractérisé en ce qu'il comprend

- a) l'obtention d'une population de cellules dendritiques,
- b) la culture des cellules dendritiques dans des conditions permettant la  
5 production de vésicules membranaires,
- c) le traitement du surnageant de culture pour produire un échantillon biologique enrichi en vésicules membranaires, notamment par une étape d'ultrafiltration ou de chromatographie d'affinité au moins, et,
- d) la purification des vésicules membranaires par un procédé comprenant au  
10 moins une étape de chromatographie d'échange d'anions et/ou de perméation de gel.

19. Procédé selon la revendication 17 ou 18, caractérisé en ce que les cellules dendritiques sont obtenues à partir d'un échantillon biologique provenant d'un sujet, par exemple de moelle osseuse ou de sang périphérique.  
15

20. Procédé selon les revendications 17 à 19, caractérisé en ce que les cellules dendritiques sont immatures.

21. Procédé selon l'une des revendications 17 à 20, caractérisé en ce que les cellules  
20 dendritiques sont sensibilisées à un antigène, préalablement à la production des vésicules membranaires.

22. Procédé selon l'une des revendications 17 à 21, caractérisé en ce que, au cours de l'étape b), les cellules dendritiques sont cultivées dans des conditions stimulant la  
25 production des vésicules membranaires.

23. Utilisation de la chromatographie d'échange d'anions pour la préparation ou la purification de vésicules membranaires.

24. Utilisation de la chromatographie d'affinité pour la préparation ou la purification de vésicules membranaires.

25. Composition comprenant des vésicules membranaires préparées par le procédé  
5 selon l'une des revendications 1 à 22.

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

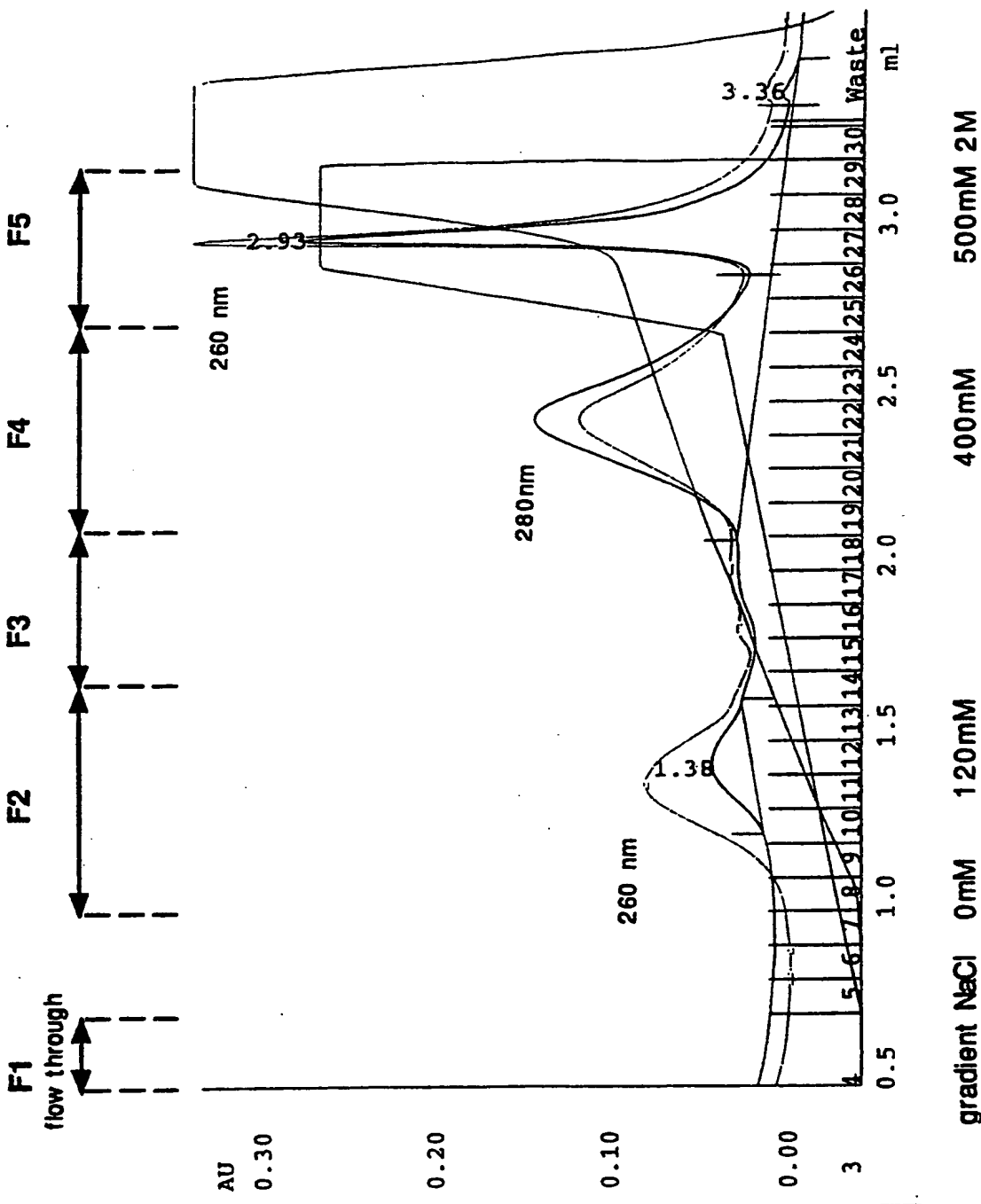


Figure 1

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

2/11

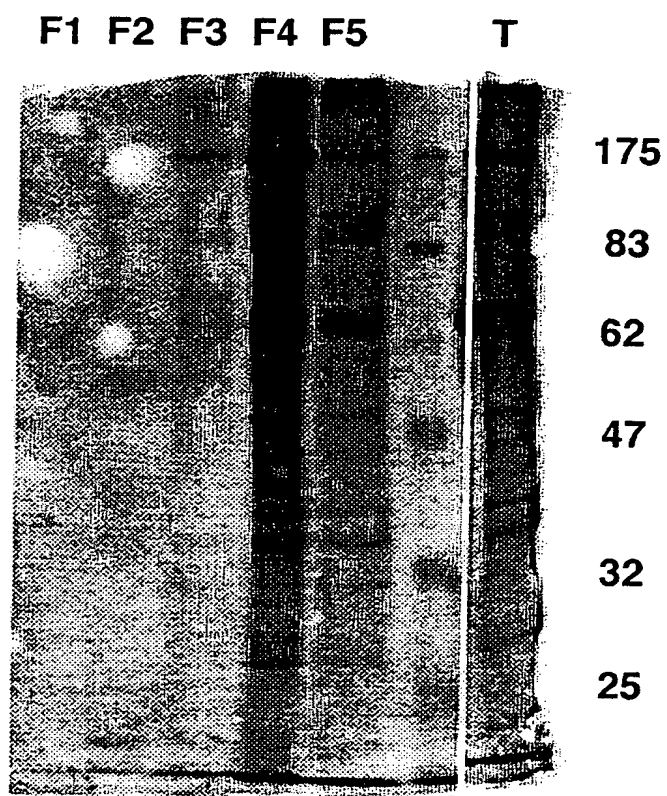


Figure 2

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

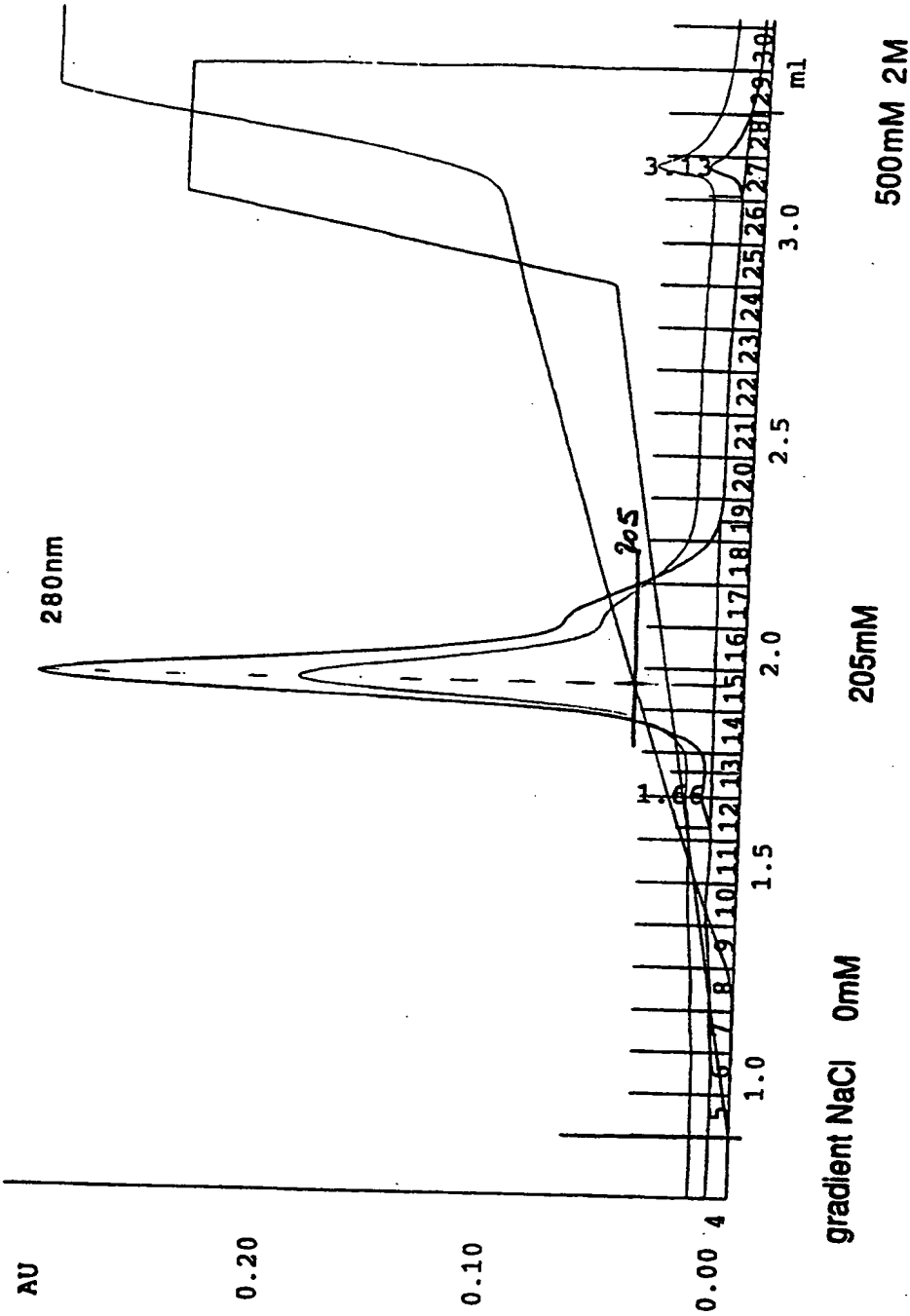


Figure 3

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

4/11

# Filtration tangentielle

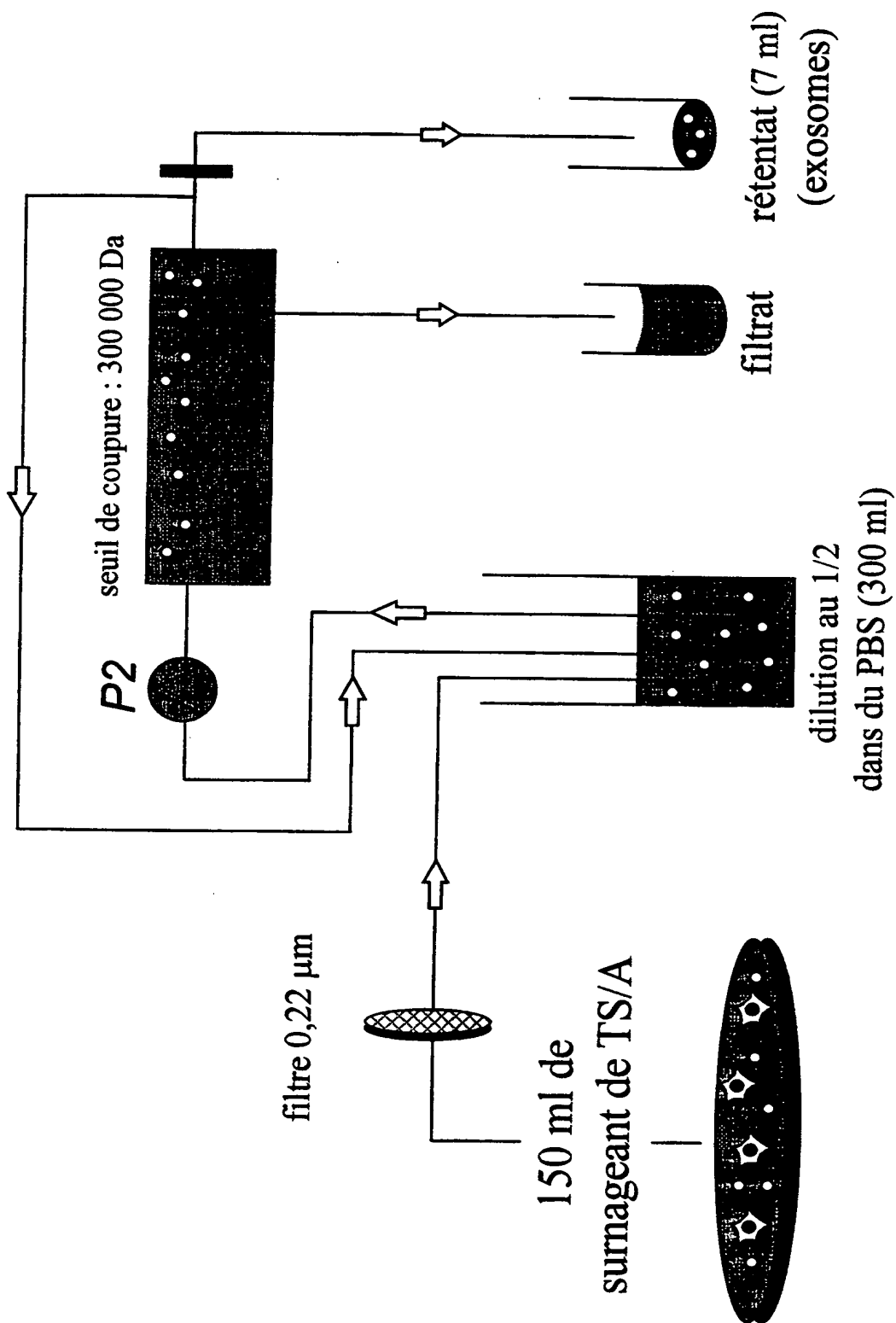


Figure 4

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

5/11

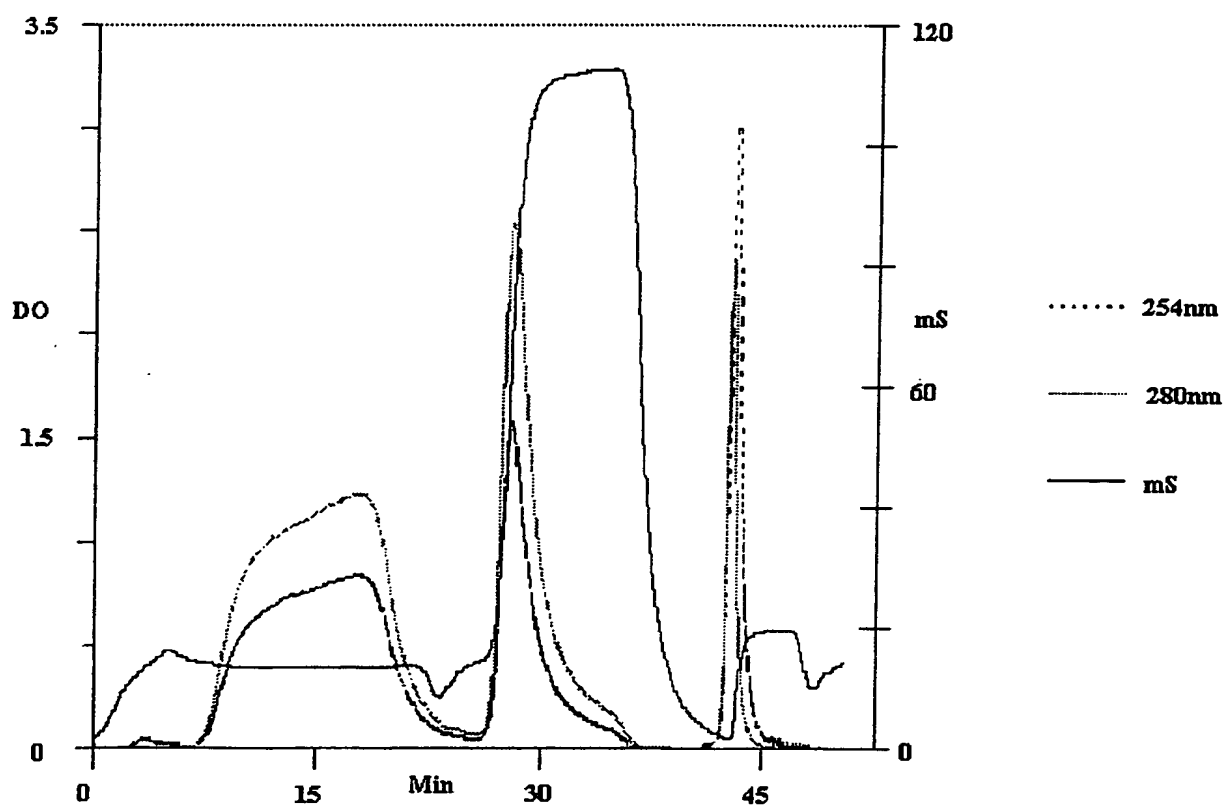


FIGURE 5

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

6/11

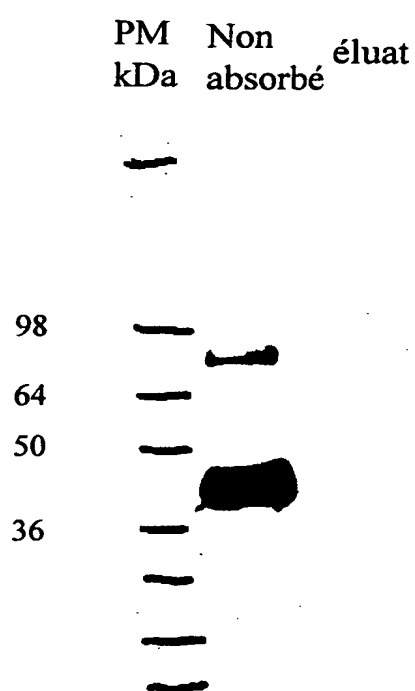


FIGURE 6

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

7/11

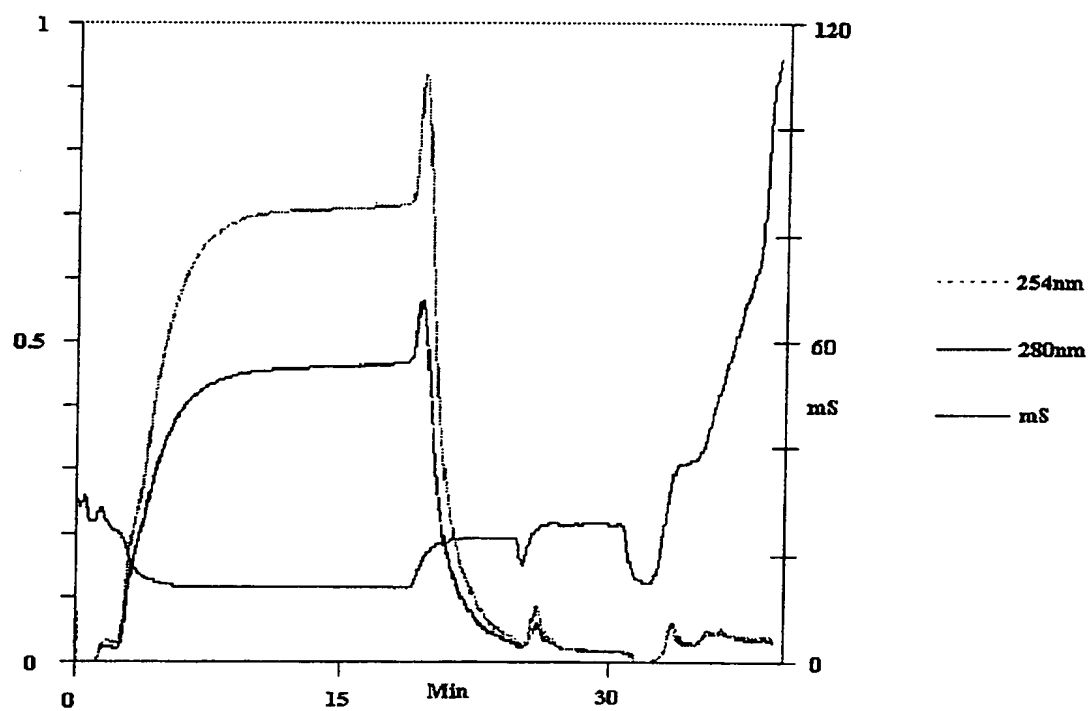


FIGURE 7

**413 PAGE BLANK (USPTO)**

8/11

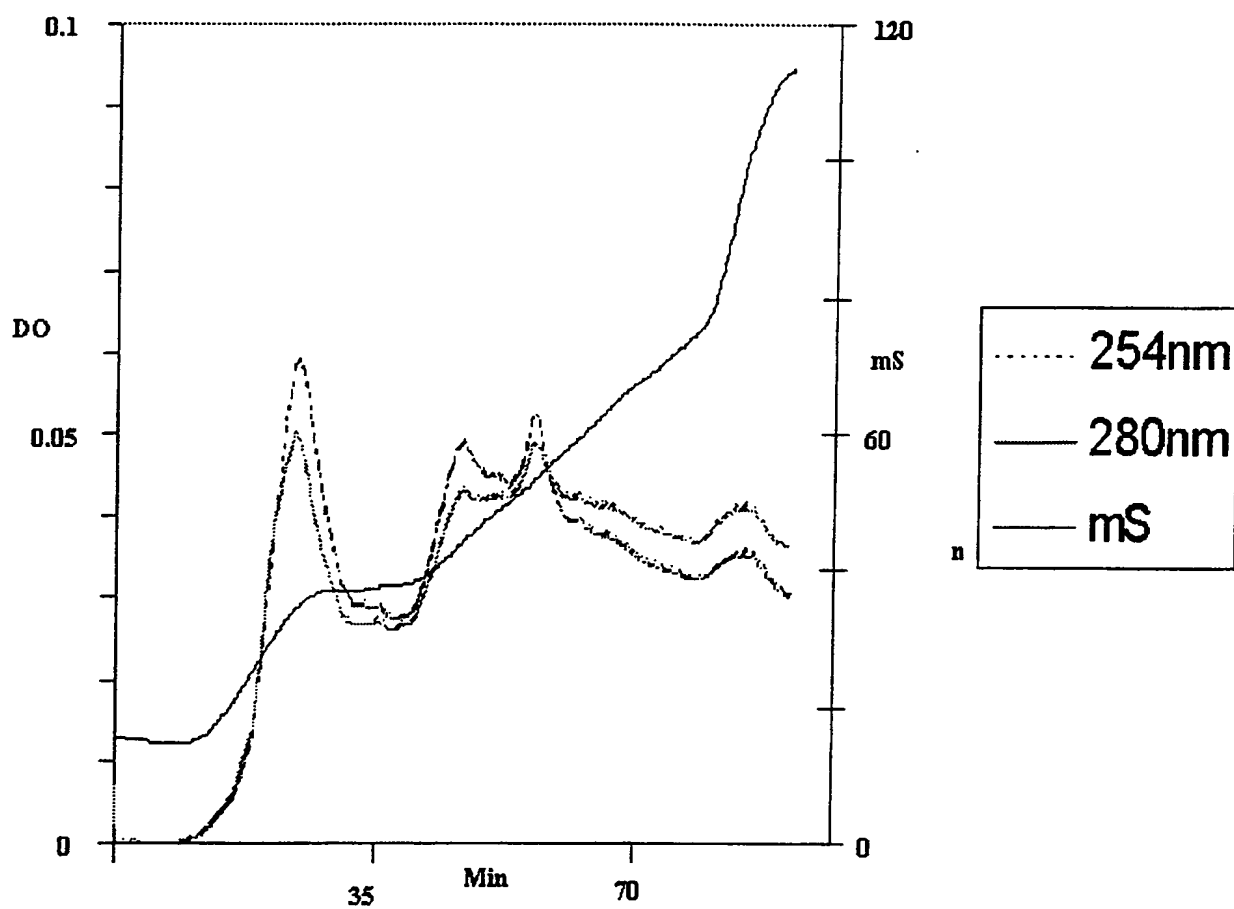


FIGURE 8

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

9/11

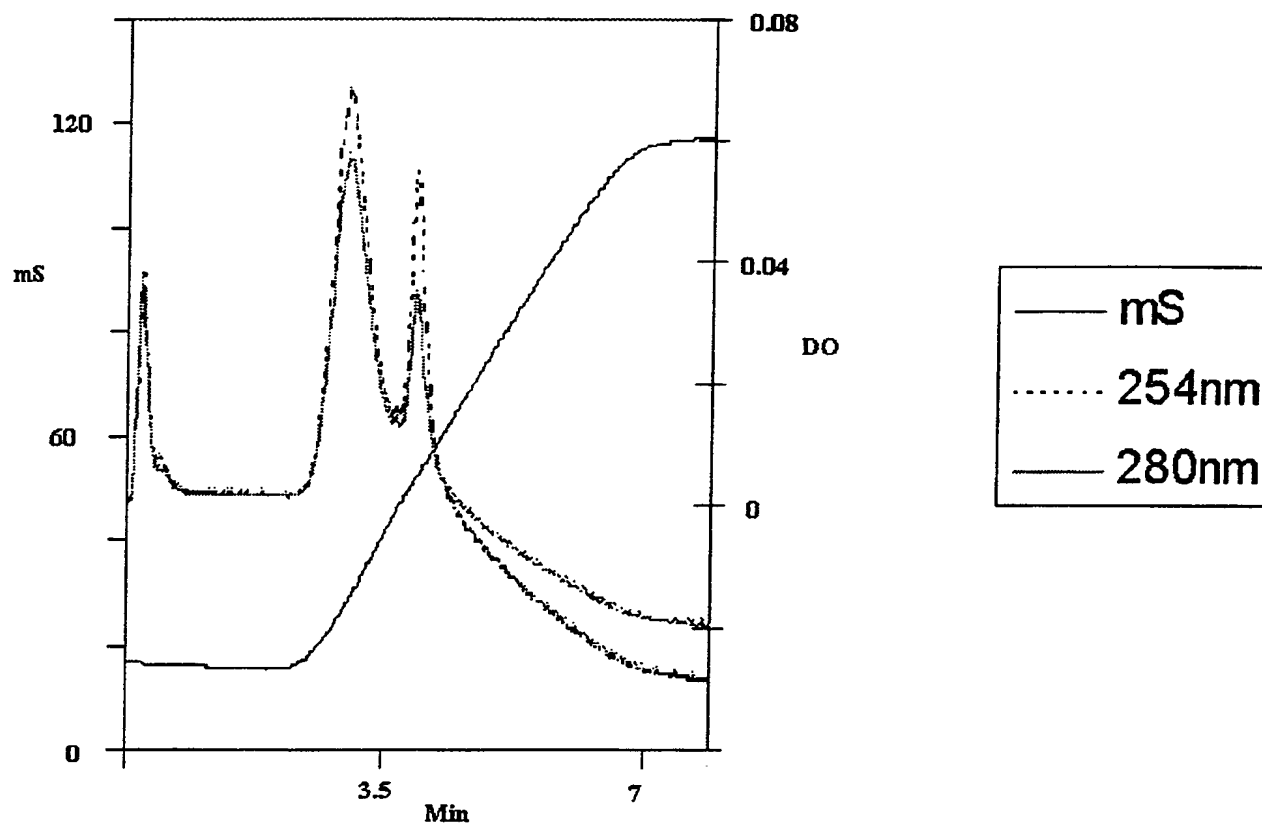


FIGURE 9

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

10/11

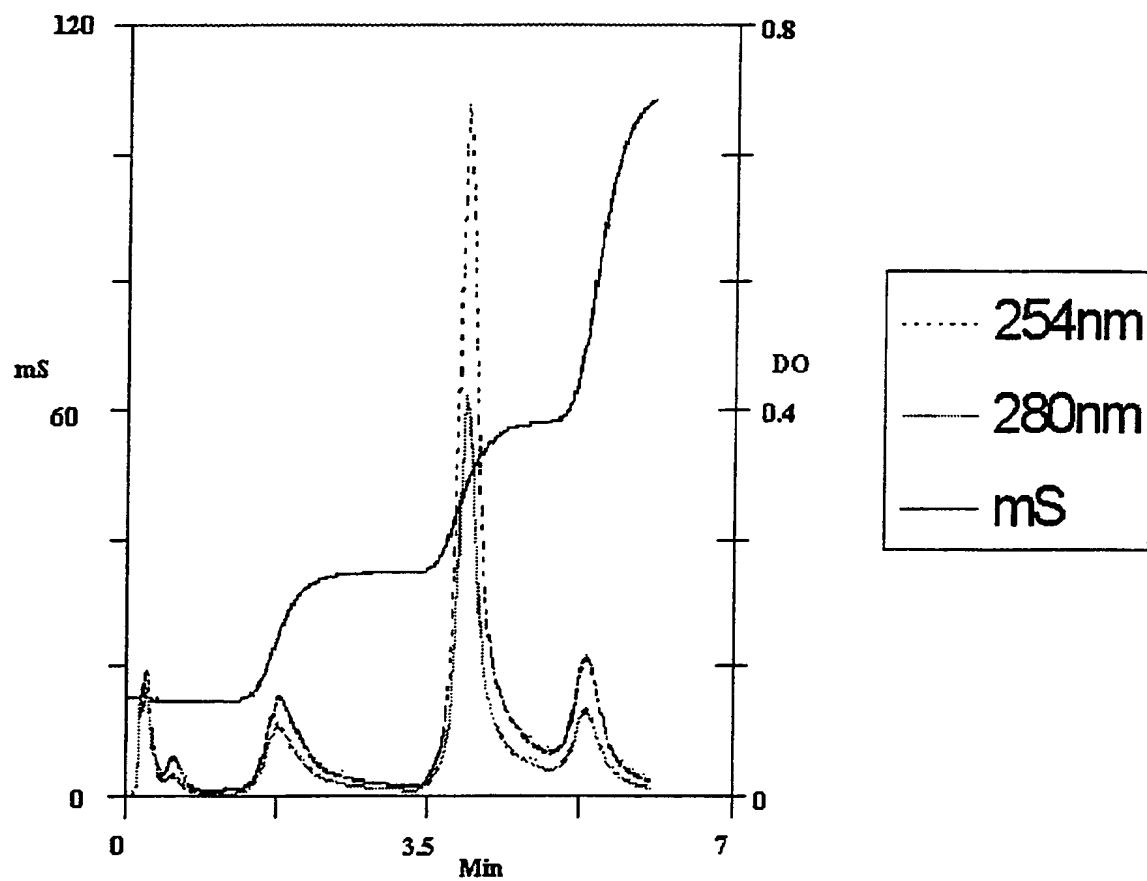


FIGURE 10

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

11/11

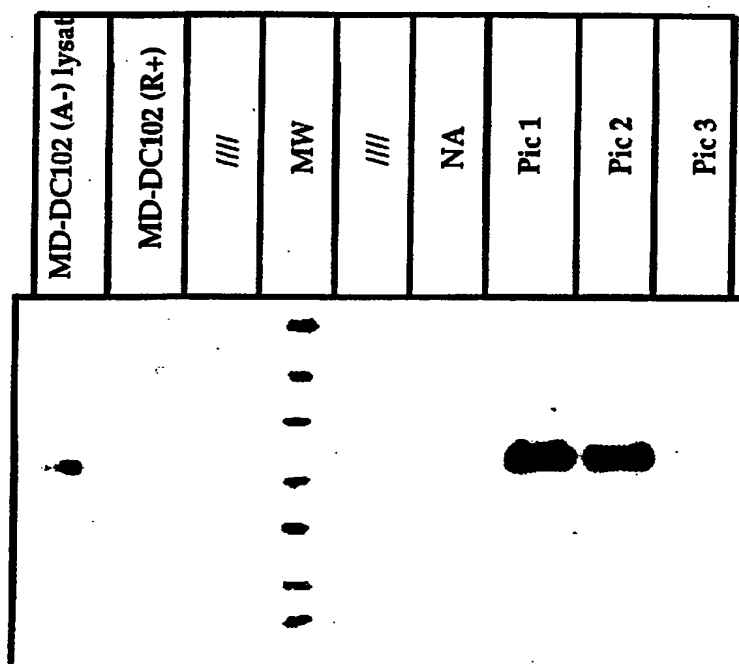


FIGURE 11

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**



## DEMANDE INTERNATIONALE PUBLIÉE EN VERTU DU TRAITE DE COOPERATION EN MATIERE DE BREVETS (PCT)

<b>(51) Classification internationale des brevets 7 :</b> <b>A61K 35/12, C12N 5/00 // A61K 39/00</b>	<b>A3</b>	<b>(11) Numéro de publication internationale:</b> <b>WO 00/44389</b> <b>(43) Date de publication internationale:</b> 3 août 2000 (03.08.00)
<b>(21) Numéro de la demande internationale:</b> PCT/FR00/00105 <b>(22) Date de dépôt international:</b> 19 janvier 2000 (19.01.00) <b>(30) Données relatives à la priorité:</b> 99/00886 27 janvier 1999 (27.01.99) FR <b>(71) Déposants (pour tous les Etats désignés sauf US):</b> AP CELLS INC. [US/US]; 1014 Hamilton Court, Menlo Park, CA 94025 (US). INSTITUT NATIONAL DE LA SANTE ET DE LA RECHERCHE MEDICALE [FR/FR]; 101, rue de Tolbiac, F-75654 Paris Cedex 13 (FR). INSTITUT CURIE [FR/FR]; 26, rue d'Ulm, F-75248 Paris Cedex 05 (FR). <b>(72) Inventeurs; et</b> <b>(75) Inventeurs/Déposants (US seulement):</b> DHELLIN, Olivier [FR/FR]; 60, boulevard de Charonne, F-75020 Paris (FR). AMIGORENA, Sebastian [FR/FR]; 124, boulevard A. Blanqui, F-75013 Paris (FR). RAMEAU, Philippe [FR/FR]; 22, allée Albert Thomas, F-91300 Massy (FR). CROUZET, Joël [FR/FR]; 12, rue Michel Voisin, F-92330 Sceaux (FR). <b>(74) Mandataire:</b> BECKER, Philippe; Cabinet Becker et Associés, 10, rue de Milan, F-75009 Paris (FR).		<b>(81) Etats désignés:</b> AE, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZA, ZW, brevet ARIPO (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZW), brevet eurasien (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), brevet européen (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), brevet OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). <b>Publiée</b> <i>Avec rapport de recherche internationale.</i> <b>(88) Date de publication du rapport de recherche internationale:</b> 16 novembre 2000 (16.11.00)
<b>(54) Title:</b> METHOD FOR PREPARING MEMBRANE VESICLES <b>(54) Titre:</b> PROCEDE DE PREPARATION DE VESICULES MEMBRANAIRES <b>(57) Abstract</b> <p>The invention concerns a method for preparing membrane vesicles from a biological sample, characterised in that it comprises at least a step which consists in treating the sample by anion-exchange chromatography and/or gel permeation. The invention is used for preparing original vesicles or of different types, in particular from cells presenting antigens or tumour cells. The invention also concerns the resulting vesicles and their uses.</p> <b>(57) Abrégé</b> <p>La présente invention concerne un procédé de préparation de vésicules membranaires à partir d'un échantillon biologique caractérisé en ce qu'il comprend au moins une étape de traitement de l'échantillon par chromatographie d'échange d'anions et/ou de perméation de gel. L'invention est utilisée pour la préparation de vésicules d'origines et de natures variées, notamment à partir de cellules présentatrices d'antigènes ou de cellules tumorales. L'invention concerne aussi les vésicules ainsi obtenues et leurs utilisations.</p>		

### UNIQUEMENT A TITRE D'INFORMATION

Codes utilisés pour identifier les Etats parties au PCT, sur les pages de couverture des brochures publiant des demandes internationales en vertu du PCT.

AL	Albanie	ES	Espagne	LS	Lesotho	SI	Slovénie
AM	Arménie	FI	Finlande	LT	Lituanie	SK	Slovaquie
AT	Autriche	FR	France	LU	Luxembourg	SN	Sénégal
AU	Australie	GA	Gabon	LV	Lettonie	SZ	Swaziland
AZ	Azerbaïdjan	GB	Royaume-Uni	MC	Monaco	TD	Tchad
BA	Bosnie-Herzégovine	GE	Géorgie	MD	République de Moldova	TG	Togo
BB	Barbade	GH	Ghana	MG	Madagascar	TJ	Tadjikistan
BE	Belgique	GN	Guinée	MK	Ex-République yougoslave de Macédoine	TM	Turkménistan
BF	Burkina Faso	GR	Grèce	ML	Mali	TR	Turquie
BG	Bulgarie	HU	Hongrie	MN	Mongolie	TT	Trinité-et-Tobago
BJ	Bénin	IE	Irlande	MR	Mauritanie	UA	Ukraine
BR	Brésil	IL	Israël	MW	Malawi	UG	Ouganda
BY	Bélarus	IS	Islande	MX	Mexique	US	Etats-Unis d'Amérique
CA	Canada	IT	Italie	NE	Niger	UZ	Ouzbékistan
CF	République centrafricaine	JP	Japon	NL	Pays-Bas	VN	Viet Nam
CG	Congo	KE	Kenya	NO	Norvège	YU	Yougoslavie
CH	Suisse	KG	Kirghizistan	NZ	Nouvelle-Zélande	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	République populaire démocratique de Corée	PL	Pologne		
CM	Cameroun	KR	République de Corée	PT	Portugal		
CN	Chine	KZ	Kazakstan	RO	Roumanie		
CU	Cuba	LC	Sainte-Lucie	RU	Fédération de Russie		
CZ	République tchèque	LI	Liechtenstein	SD	Soudan		
DE	Allemagne	LK	Sri Lanka	SE	Suède		
DK	Danemark	LR	Libéria	SG	Singapour		
EE	Estonie						

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In International Application No  
PCT/FR 00/00105

**A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**  
IPC 7 A61K35/12 C12N5/00 //A61K39/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

**B. FIELDS SEARCHED**

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)  
IPC 7 C12N A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

WPI Data, EPO-Internal, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data

**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	FR 2 766 205 A (INSERM ET AL.) 22 January 1999 (1999-01-22) page 7, line 23 - line 27; claim 4 ----	1-25
A	G. RAPOSO ET AL.: "B LYMPHOCYTES SECRETE ANTIGEN-PRESENTING VESICLES." JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 183, March 1996 (1996-03), pages 1161-1172, XP002060486 NEW YORK, N.Y., US cited in the application page 1162, left-hand column, paragraph 5 -right-hand column, paragraph 1, ----	1-25
A	WO 97 05900 A (RIJKSUNIVERSITEIT TE LEIDEN) 20 February 1997 (1997-02-20) claims 1,6,9 ----- -/-	1-25

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

\* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

19 July 2000

Date of mailing of the international search report

25/07/2000

Name and mailing address of the ISA  
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ryckebosch, A

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

In. ational Application No

PCT/FR 00/00105

## C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	<p>WO 99 03499 A (INSERM ET AL.)  28 January 1999 (1999-01-28)  cited in the application  page 11, line 1 -page 12, line 22; claims  1,6,10-13,17,20-23,26-33,36  page 13, line 17 -page 14, line 23  page 16, line 28 -page 17, line 10  page 20, line 30 -page 21, line 12  page 22, line 7 - line 11  page 24, line 28 -page 28, line 3</p> <p>-----</p>	<p>5,6,  9-16,  18-22,25</p>

# INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

In. tional Application No

PCT/FR 00/00105

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
FR 2766205 A	22-01-1999	AU 8446498 A EP 1001806 A WO 9903499 A	10-02-1999 24-05-2000 28-01-1999
WO 9705900 A	20-02-1997	AU 6632496 A CA 2225553 A EP 0841945 A JP 11510507 T	05-03-1997 20-02-1997 20-05-1998 14-09-1999
WO 9903499 A	28-01-1999	FR 2766205 A FR 2774697 A AU 8446498 A EP 1001806 A	22-01-1999 13-08-1999 10-02-1999 24-05-2000

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D. Code Internationale No  
PCT/FR 00/00105

A. CLASSEMENT DE L'OBJET DE LA DEMANDE  
CIB 7 A61K35/12 C12N5/00 //A61K39/00

Selon la classification internationale des brevets (CIB) ou à la fois selon la classification nationale et la CIB

## B. DOMAINES SUR LESQUELS LA RECHERCHE A PORTE

Documentation minimale consultée (système de classification suivi des symboles de classement)

CIB 7 C12N A61K

Documentation consultée autre que la documentation minimale dans la mesure où ces documents relèvent des domaines sur lesquels a porté la recherche

Base de données électronique consultée au cours de la recherche internationale (nom de la base de données, et si réalisable, termes de recherche utilisés)

WPI Data, EPO-Internal, PAJ, BIOSIS, CHEM ABS Data

## C. DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités, avec, le cas échéant, l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
A	FR 2 766 205 A (INSERM ET AL.) 22 janvier 1999 (1999-01-22) page 7, ligne 23 - ligne 27; revendication 4	1-25
A	G. RAPOSO ET AL.: "B LYMPHOCYTES SECRETE ANTIGEN-PRESENTING VESICLES." JOURNAL OF EXPERIMENTAL MEDICINE, vol. 183, mars 1996 (1996-03), pages 1161-1172, XP002060486 NEW YORK, N.Y., US cité dans la demande page 1162, colonne de gauche, alinéa 5 -colonne de droite, alinéa 1	1-25
A	WO 97 05900 A (RIJKSUNIVERSITEIT TE LEIDEN) 20 février 1997 (1997-02-20) revendications 1,6,9	1-25



Voir la suite du cadre C pour la fin de la liste des documents



Les documents de familles de brevets sont indiqués en annexe

\* Catégories spéciales de documents cités:

- "A" document définissant l'état général de la technique, non considéré comme particulièrement pertinent
- "E" document antérieur, mais publié à la date de dépôt international ou après cette date
- "L" document pouvant jeter un doute sur une revendication de priorité ou cité pour déterminer la date de publication d'une autre citation ou pour une raison spéciale (telle qu'indiquée)
- "O" document se référant à une divulgation orale, à un usage, à une exposition ou tous autres moyens
- "P" document publié avant la date de dépôt international, mais postérieurement à la date de priorité revendiquée

- "T" document ultérieur publié après la date de dépôt international ou la date de priorité et n'appartenant pas à l'état de la technique pertinent, mais cité pour comprendre le principe ou la théorie constituant la base de l'invention
- "X" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme nouvelle ou comme impliquant une activité inventive par rapport au document considéré isolément
- "Y" document particulièrement pertinent; l'invention revendiquée ne peut être considérée comme impliquant une activité inventive lorsque le document est associé à un ou plusieurs autres documents de même nature, cette combinaison étant évidente pour une personne du métier
- "&" document qui fait partie de la même famille de brevets

Date à laquelle la recherche internationale a été effectivement achevée

19 juillet 2000

Date d'expédition du présent rapport de recherche internationale

25/07/2000

Nom et adresse postale de l'administration chargée de la recherche internationale

Office Européen des Brevets, P.B. 5818 Patentlaan 2  
NL - 2280 HV Rijswijk  
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,  
Fax: (+31-70) 340-3016

Fonctionnaire autorisé

Ryckebosch, A

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

D. .nde Internationale No

PCT/FR 00/00105

## C.(suite) DOCUMENTS CONSIDERES COMME PERTINENTS

Catégorie	Identification des documents cités. avec le cas échéant. l'indication des passages pertinents	no. des revendications visées
P, X	<p>WO 99 03499 A (INSERT ET AL.)  28 janvier 1999 (1999-01-28)  cité dans la demande  page 11, ligne 1 -page 12, ligne 22;  revendications 1,6,10-13,17,20-23,26-33,36  page 13, ligne 17 -page 14, ligne 23  page 16, ligne 28 -page 17, ligne 10  page 20, ligne 30 -page 21, ligne 12  page 22, ligne 7 - ligne 11  page 24, ligne 28 -page 28, ligne 3  -----</p>	<p>5,6,  9-16,  18-22,25</p>

# RAPPORT DE RECHERCHE INTERNATIONALE

Renseignements relatifs aux membres de familles de brevets

De .de Internationale No

PCT/FR 00/00105

Document brevet cité au rapport de recherche	Date de publication	Membre(s) de la famille de brevet(s)	Date de publication
FR 2766205 A	22-01-1999	AU 8446498 A	10-02-1999
		EP 1001806 A	24-05-2000
		WO 9903499 A	28-01-1999
WO 9705900 A	20-02-1997	AU 6632496 A	05-03-1997
		CA 2225553 A	20-02-1997
		EP 0841945 A	20-05-1998
		JP 11510507 T	14-09-1999
WO 9903499 A	28-01-1999	FR 2766205 A	22-01-1999
		FR 2774697 A	13-08-1999
		AU 8446498 A	10-02-1999
		EP 1001806 A	24-05-2000

**THIS PAGE BLANK (USPTO)**